

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Física de la Materia Condensada



**Análisis estructural y funcional de proteínas de la vía
alternativa del complemento mediante microscopía
electrónica**

TESIS DOCTORAL

César Rodríguez Gallego

Madrid, 2017



A mi familia



Agradecimientos

ÍNDICE GENERAL

1 Introducción

- 1.1 El Sistema del Complemento
- 1.2 Activación del Complemento
 - 1.2.1 Vías de Activación
 - Vía Clásica (CP)
 - Vía de las Lectinas (LP)
 - Vía Alternativa (AP)
 - 1.2.2 Vía Lítica o Terminal de confluencia de las 3 vías
- 1.3 Estructura de las proteínas del complemento
 - 1.3.1 Estructura de C3 y C3b
 - 1.3.2 Estructura de iC3b
 - 1.3.3 Estructura de factor B (fB) y Triada Catalítica
 - Tríada Catalítica
 - 1.3.4 Regulación de la Vía Alternativa del Complemento
- 1.4 ME y reconstrucción 3D de partículas individuales
 - 1.4.1 El microscopio electrónico de transmisión
 - 1.4.2 Preparación de muestras para ME
 - Tinción Negativa
 - Crio-microscopía Electrónica
 - 1.4.3 Adquisición de datos
 - 1.4.4 Procesamiento de imagen
 - 1.4.5 Reconstrucción 3D

2 Objetivos

3 Materiales y Métodos

- 3.1 Proteínas del complemento de estudio
- 3.2 Amplificación del ADN por secuenciación y PCR
- 3.3 Plásmidos y construcciones
- 3.4 Mutagénesis dirigida
- 3.5 Cultivos de células de mamífero
 - 3.5.1 Líneas celulares
 - 3.5.2 Transfecciones transitorias
 - 3.5.3 Transfecciones estables
- 3.6 Ensayos de ELISA
 - 3.6.1 Protocolo general
 - 3.6.2 Cuantificación de C3 humano

- 3.6.3 Cuantificación de fB humano
- 3.6.4 Determinación del isotipo de anticuerpo
- 3.6.5 Caracterización de la reactividad de los anticuerpos analizados
- 3.7 Purificación de proteínas
 - 3.7.1 Purificación de fB humano
 - 3.7.2 Purificación de C3 humano
 - Generación de C3b
 - Generación de iC3b
 - Generación de C3dg
 - 3.7.3 Purificación de anticuerpos de diversos fragmentos de C3
- 3.8 Análisis bioquímico de proteínas
 - 3.8.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
 - 3.8.2 Inmunodetección mediante Western Blot
- 3.9 Cromatografía de exclusión molecular
- 3.10 Cromatografía de afinidad
- 3.11 Cromatografía de intercambio iónico
- 3.12 Generación y purificación de fragmentos Fab
- 3.13 Análisis de los inmunocomplejos mediante cromatografía de exclusión molecular
 - Formación de complejos anticuerpo iC3b
- 3.14 Ensayos en fase fluida
 - Ensayo de inhibición del corte de C3
- 3.15 Ensayos de SPR
- 3.16 Ensayos de SAXS
- 3.17 Microscopía Electrónica de Transmisión
 - 3.17.1 Preparación de las muestras
 - 3.17.2 Adquisición de datos
 - 3.17.3 Procesamiento digital de imágenes
 - 3.17.4 Alineamiento y clasificación 2D de partículas individuales
- 3.18 Reconstrucción tridimensional
 - 3.18.1 Generación de volúmenes iniciales
 - 3.18.2 Refinamiento angular
 - 3.18.3 Estimación de la resolución
- 3.19 Visualización y ajuste de estructuras atómicas

4 Resultados

- 4.1 Estructura de iC3b resuelta mediante microscopía electrónica a 24 Å
 - 4.1.1 La ME muestra que iC3b presenta una conformación bien definida
 - 4.1.2 Estructura 3D de iC3b
 - Cambio de los dominios TED y CUB en C3, C3b e iC3b
 - 4.1.3 Estructura de iC3b en solución, obtenida mediante SAXS
- 4.2 Caracterización bioquímica y estructural de C3-16.4

- 4.2.1 Generación de anticuerpos monoclonales frente a C3
 - Estructura de un anticuerpo monoclonal (mAb)
- 4.2.2 Generación del fragmento Fab de C3-16.4
- 4.2.3 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)
- 4.2.4 Microscopía Electrónica del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)
- 4.2.5 Estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)
 - Validación de la estructura de iC3b/Fab (C3-16.4)
- 4.2.6 Estructura 3D del inmunocomplejo C3b/Fab (C3 16.4)
- 4.3 Caracterización bioquímica y estructural C3-12-17
 - 4.3.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)
 - 4.3.2 Microscopía Electrónica del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)
 - 4.3.3 Estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)
 - Validación de la estructura de iC3b/Fab (C3-12.17)
 - 4.3.4 Estructura 3D del inmunocomplejo C3b/Fab (C3-12.17)
 - 4.3.5 Estructura 3D del inmunocomplejo C3b/Fab (C3-42.3)
- 4.4 Caracterización bioquímica y estructural de C3-12.2
 - 4.4.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2)
 - 4.4.2 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2)
 - 4.4.3 Estructura de inmunocomplejos C3-12.2
 - 4.4.4 Resumen de los epítomos reconocidos por los anticuerpos de C3

5 Discusión

- 5.1 Estructura de iC3b
 - 5.1.1 Estructura de iC3b por ME-3D
 - 5.1.2 iC3b muestra distintas conformaciones dependiendo del estado
 - 5.1.3 Consecuencias de la conformación de iC3b en la unión a fB
- 5.2 Anticuerpos dirigidos frente a fragmentos de C3
 - 5.2.1 A partir del trabajo con mAbs
 - 5.2.2 Diseñando una estrategia para generar mAbs que señalen superficies relevantes en C3 activado
 - 5.2.3 Bases estructurales de inhibición de la AP por C3-12.17 y C3-42.3
 - 5.2.4 C3-12.17 y C3-42.3 inhibe la AP bloqueando la interacción de C3 con la C3-convertasa de la AP
 - 5.2.5 Bases estructurales de la inhibición de la AP mediante C3-16.4
 - 5.2.6 C3-16.4 inhibe la AP previniendo la formación de la C3 convertasa
 - 5.2.7 C3-12.2 reconoce específicamente un nuevo epítomo en iC3b que se encuentra preservado en C3d

6 Conclusiones

7 Bibliografía

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1 Esquema de activación y funciones del complemento

Fig. 1.2 Vías de activación del complemento

Fig. 1.3 Estructura de C3 y C3b

Fig. 1.4 Activación de C3 y productos de degradación

Fig. 1.5 Estructura de factor B

Fig. 1.6 Centro catalítico de quimotripsina, factor B y Bb

Fig. 1.7 Reguladores de la convertasa de C3

Fig. 1.8 Estructura de C3b en complejo con el regulador fH

Fig. 1.9 Representación estructural de la formación y activación de proconvertasas de la vía alternativa

Fig. 1.10 Técnicas de preparación de muestras para ME

Fig. 1.11 Preparación de muestras y determinación de la estructura mediante Crio-ME

Fig. 1.12 Esquema del procesamiento de imágenes

Fig. 3.1 [Esquema de](#) PCR de los exones de fB, de los diferentes mutantes catalíticos sobre fB y fBD279G

Fig. 4.1.1 Purificación de iC3b

Fig. 4.1.2 Purificación de iC3b

Fig. 4.1.3 ME de partículas de iC3b

Fig. 4.1.4 ME de iC3b

Fig. 4.1.5 Medias 2D de iC3b

Fig. 4.1.6 Media 2D libre de referencia seleccionada de una vista típica de iC3b

Fig. 4.1.8 ME de iC3b. Reconstrucción RCT de iC3b

Fig. 4.1.9 Cobertura angular de las imágenes en el set de datos de iC3b y resolución

Fig. 4.1.10 Análisis de la heterogeneidad de iC3b

Fig. 4.1.11 Estructura de iC3b obtenida mediante ME-3D

Fig. 4.1.12 Estructura 3D de iC3b

Fig. 4.1.13 Estructura global de iC3b obtenida mediante SAXS

Fig. 4.2.1 Arquitectura 3D de un anticuerpo monoclonal (mAb)

Fig. 4.2.2. Análisis del fragmento Fab 16.4 y purificación de iC3b

Fig. 4.2.3 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Fig. 4.2.4 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Fig. 4.2.5. Estrategias de procesamiento del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Fig. 4.2.6 Estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Fig. 4.2.7 Validación y resolución de la estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Fig. 4.2.8 Estructura de inmunocomplejos de C3-16.4

Fig. 4.3.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

Fig. 4.3.2 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

Fig. 4.3.3 Estrategias de procesamiento del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

Fig. 4.3.4 Estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

Fig. 4.3.5 Validación y resolución de la estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

Fig. 4.3.6 Medias 2D y estructura 3D del inmunocomplejo C3-12.17

Fig. 4.3.7 Imagen representativa 2D (arriba) y estructura 3D (abajo) del fragmento Fab C3-12.17 unido a iC3b

Fig. 4.3.8 Arquitectura del inmunocomplejo C3b/Fab (C3-42.3)

Fig. 4.4.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2)

Fig. 4.4.2 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2)

Fig. 4.4.3 Medias 2D de iC3b/Fab (C3-12.2) a partir de KenDerSom

Fig. 4.4.4 Imagen 2D del complejo C3dg/Fab (C3-12.2)

Fig. 4.4.5 Detección de fragmentos de C3 en WB por el anticuerpo C3-12.2

Fig. 5.1 Arquitectura Molecular de iC3b

Fig. 5.2 Estructura 3D de iC3b

Fig. 5.3 Mapa de diferencia en HX entre C3b e iC3b sobre la estructura de C3b

Fig. 5.4 fB no forma convertasa con iC3b

Fig. 5.5 iC3b no induce corte de fB en presencia de fD

Fig. 5.6 La conformación de iC3b es compatible con la unión de CRIg e incompatible con la unión de fH

Fig. 5.7 Visión estructural de complejos que regulan a C3b

Fig. 5.8 La conformación de iC3b influye en el corte de fI en presencia de cofactores fH, sMCP, y sCR1

Fig. 5.9 Efectos funcionales de C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 en la activación e inactivación *in vitro* de C3

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Proteínas del complemento estudiadas en este trabajo

Tabla 3.2 Oligonucleótidos empleados en la ampliación y la secuenciación del gen Fb

Tabla 3.3 Cebadores empleados en la secuenciación de fB

Tabla 3.4 Oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida de fBD279G

Tabla 3.5 Cebadores (*primers*) empleados en la mutagénesis de los mutantes catalíticos a partir del mutante estructural de fBD279G

Tabla 3.6 Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la detección de proteínas mediante ensayos de Western Blot y ELISA

Tabla 3.7 Cromatografía de exclusión molecular

Tabla 3.8 Cromatografía de afinidad

Tabla 3.9 Cromatografía de intercambio iónico

Tabla 3.10 Estructuras atómicas encajadas en los mapas de ME-3D y sus correspondientes códigos PDB

Tabla 4.1 Comparación de resultados entre las diferentes técnicas

Tabla 4.2 Caracterización de los mAbs de estudio

Tabla 4.3 Caracterización funcional de los cuatro mAbs

Tabla 5.1 Resumen y comparativa de unión entre reguladores de la vía alternativa del complemento, y C3b e iC3b

Tabla 5.2 Caracterización de cuatro mAbs

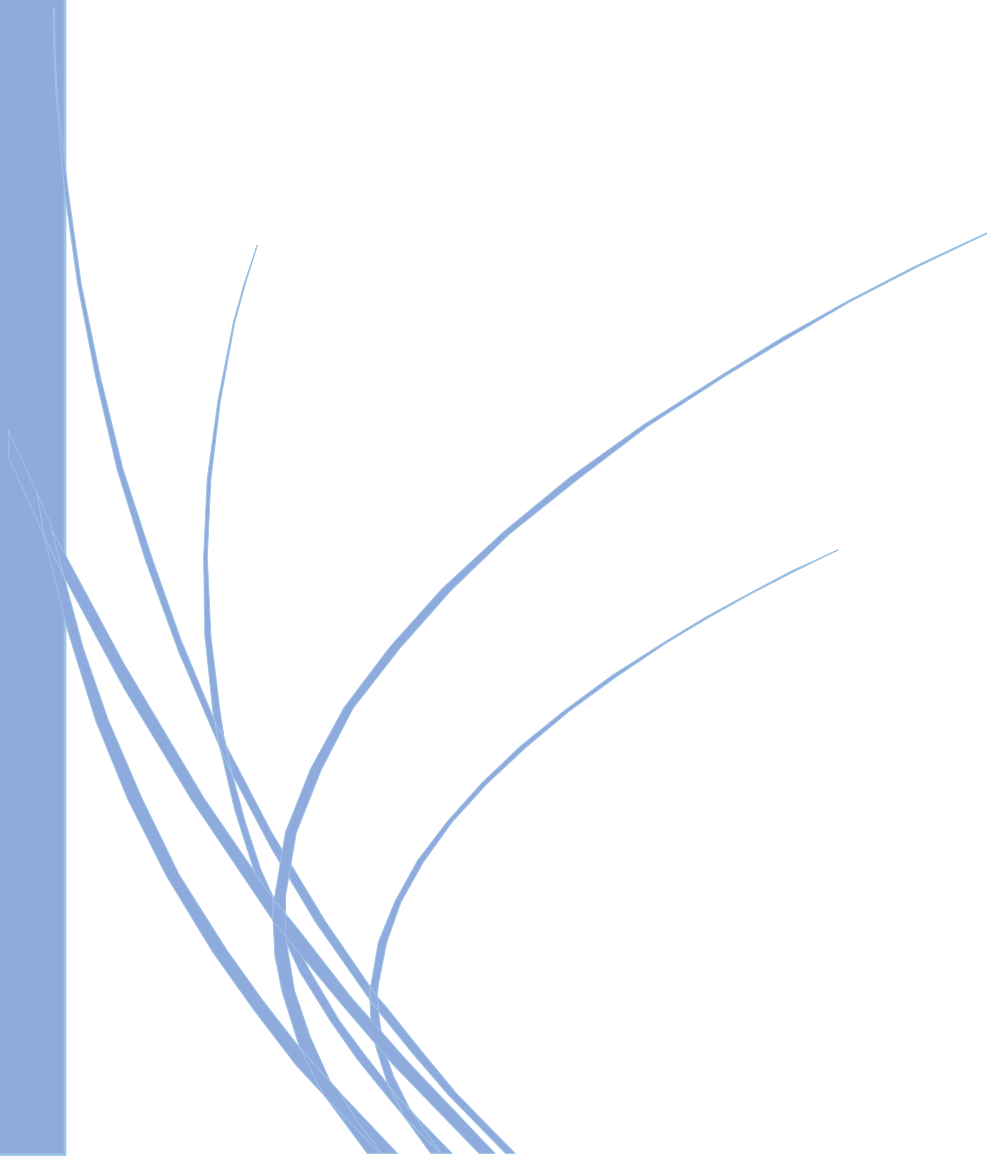
Abreviaturas y símbolos

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A	Ala, Alanina
Å	Angstrom
Ab	<i>Antibody</i>
AP	<i>Alternative Pathway</i>
Arg	Arginina
Bis-Tris	<i>Bis(2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxymethyl) methane</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
BSOFT	<i>Bernard's software</i>
°C	grado centígrado
C1-inh	<i>C1-inhibitor</i>
C345c	<i>Complement C3, C4 and C5 C-terminal</i>
C-terminal	Carboxilo Terminal
CCD	<i>Charged Coupled Device</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cm	centímetro
CP	<i>Classical Pathway</i>
CR1	<i>Complement receptor 1</i>
Crio	criomicroscopía electrónica
CTF	<i>Contrast Transfer Function</i>
CUB	<i>Complement C1r/C1s, UEGF, BMP1</i>
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CTD	<i>C-terminal domain</i>
CTF	<i>Contrast transfer function</i>
DAF	<i>Decay Accelerating Factor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad Óptica
DTT	ditiotreitól
e⁻	electrones

<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
EGTA	<i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMAN	<i>Electron micrograph analysis</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FSC	<i>Fourier Shell Correlation</i>
Fig.	Figura
G	Gly, Glicina
g	Gramo
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	<i>N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IPTG	Isopropil-β-D-1-triogalactopiranosido
kDa	kilodalton
KerDenSOM	<i>Kernel density self organizing map</i>
kV	kilovoltio
LaB₆	Hexaboruro de Lantano
LP	Lectin Pathway
μg	microgramo
μl	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
M	molar
m	metro
mAU	<i>miliAbsorbance Units</i>
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MBL	<i>Manose Binding Lectin</i>
MCP	<i>Membrane Cofactor Protein</i>
ME	microscopía electrónica

ME-3D	Microscopía electrónica tridimensional
MET	Microscopio/microscopía electrónico/a de transmisión
mg	miligramo
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	minutos
MIDAS	<i>Metal Ion-Dependent Adhesion Site</i>
ml	mililitro
ML2D	<i>Maximum likelihood two-dimensional classification</i>
ML3D	<i>Maximum likelihood three-dimensional classification</i>
mM	milimolar
mmol	milimol
mRNA	ARN mensajero
N-terminal	amino terminal
NaCl	Cloruro sódico
ng	nanogramo
nm	nanómetro
nt	nucleótido
oligo	oligo-desoxirribonucleótido
OH	hidróxido
p/v	peso/volumen
Pa	pascal
PAGE	<i>Polyacrylamide-gel electrophoresis</i>
pb	pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PhD	<i>Philosophiæ Doctor</i>
pI	Punto isoeléctrico
pmol	picomol
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
pol	polimerasa
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
RCA	<i>Regulators of Complement Activation</i>

RCT	<i>Random Conical Tilt</i>
R2D	refine2d_py
RMN	resonancia magnética nuclear
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	revoluciones por minuto
RX	cristalografía de rayos X
SAXS	<i>Small-angle X-ray Scattering</i>
SCR	<i>Short Consensus Repeat</i>
SDS	<i>Sodium dodecylsulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SP	<i>Serine Protease</i>
SPIDER:	<i>System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related fields</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
T	Treonina
TBE	Tris-Borato EDTA
TED	<i>Thioester-Containing Domain</i>
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilen-diamina
Tris	<i>Tris (hydroxymethyl) aminomethane</i>
Tween20	polisorbato 20
UV	ultravioleta
V	voltio
v/v	volumen/volume
vWA	<i>Von Willebrand factor type A</i>
WB	<i>western blot</i>
XMIPP	<i>X-Window-based Microscopy Image Processing Package</i>



Summary

Summary

Complement is an essential component of innate immunity and a major trigger of inflammatory responses. The proteolytic cleavage of C3 to generate C3b is the central and most important step in the activation of complement. The comparison of the crystal structures of C3 and C3b illustrates large conformational changes during the transition from C3 to C3b. Exposure of a reactive thio-ester group allows C3b to bind covalently to surfaces such as pathogens or apoptotic cellular debris. The displacement of the thio-ester-containing domain (TED) exposes hidden surfaces that mediate the interaction with complement factor B to assemble the C3-convertase of the alternative pathway (AP). A critical step in complement activation is the formation of the C3 convertase of the alternative pathway (AP), a labile bimolecular complex formed by activated fragments of the C3 and factor B components that are fundamental to provide exponential amplification of the initial complement trigger. Regulation of the AP C3 convertase is essential to maintain complement homeostasis in plasma and to protect host cells and tissues from damage by complement. In addition, the displacement of the TED and its interaction with the macroglobulin 1 (MG1) domain generates an extended surface in C3b where the complement regulators factor H (FH), decay accelerating factor (DAF), membrane cofactor protein (MCP) and complement receptor 1 (CR1) can bind, mediating accelerated decay of the AP C3-convertase and proteolytic inactivation of C3b.

Surface-bound C3b is proteolyzed to iC3b by factor I and appropriate cofactors. iC3b then interacts with the complement receptors (CR) of the Ig superfamily, CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) on leukocytes, down-modulating inflammation, enhancing B cell-mediated immunity, and targeting pathogens for clearance by phagocytosis. Using EM we present a medium-resolution structure of iC3b (24 Å). iC3b displays a unique conformation with structural features distinct from any other C3 fragment. The macroglobulin ring in iC3b is similar to that in C3b, whereas the TED domain and the remnants of the CUB domain have moved to locations more similar to where they were in native C3. A consequence of this large conformational change is the disruption of the factor B binding site, which renders iC3b unable to assemble a C3-convertase. This structural model also justifies the decreased

interaction between iC3b and complement regulators and the recognition of iC3b by the CR of the Ig superfamily, CR2, CR3, and CR4. These data further illustrate the extraordinary conformational versatility of C3 to accommodate a great diversity of functional activities. In addition, the conformational heterogeneity in C3b and iC3b impacts complement regulation by affecting the interaction with regulators.

C3 sequentially generates various proteolytic fragments, C3a, C3b, iC3b, C3dg, each of them exposing novel surfaces, which are sites of interaction with other proteins. C3 and its fragments are therapeutic targets and markers of complement activation. We report the structural and functional characterization of four monoclonal antibodies (mAbs) generated by immunizing C3-deficient mice with a mixture of human C3b, iC3b and C3dg fragments, and discuss their potential applications. This collection includes three mAbs interacting with native C3 and inhibiting AP complement activation; two of them by blocking the cleavage of C3 by the AP C3-converase and one by impeding formation of the AP C3-convertase. The interaction sites of these mAbs in the target molecules were determined by resolving the structures of Fab fragments bound to C3b and/or iC3b using electron microscopy. A fourth mAb specifically recognizes the iC3b, C3dg, and C3d fragments. Because well-characterized anti-complement mAbs are uncommon, the mAbs reported here may offer interesting therapeutic and diagnostic opportunities.



1 Introducción

1.1 El Sistema del Complemento

El sistema del complemento es una parte esencial dentro del sistema inmunitario innato. (Abbas A, *et al.*, 2000). Su función principal es la de actuar como una primera barrera de defensa frente a infecciones y presenta un papel determinante en la eliminación de restos apoptóticos y una función inmuno-reguladora actuando en conjunto con la respuesta inmunitaria adaptativa. El complemento consta de un conjunto de más de 30 proteínas, plasmáticas y de membrana, que interaccionan entre sí, en forma de cascada de amplificación, constituyendo el principal elemento de la respuesta inmunitaria innata,

Las funciones principales del complemento son:

Defensa frente a infecciones. El complemento actúa en la eliminación de patógenos mediante su activación en la superficie del mismo y formación de un poro mediante el complejo de ataque a membrana MAC (del inglés, *Membrane Attack Complex*) que provoca la lisis del patógeno.

Opsofagocitosis. La activación del sistema del complemento sobre una superficie extraña genera anafilotoxinas (C3a y C5a), que provocan procesos de quimiotaxis sobre leucocitos en el lugar de infección, y actúan sobre mastocitos, neutrófilos y células endoteliales produciendo una inflamación local.

Función inmuno-reguladora. Participa en la modulación de la respuesta inmune adaptativa, potenciando la respuesta humoral mediada por anticuerpos y la proliferación de linfocitos B y T.

Eliminación de inmunocomplejos y células apoptóticas. La unión de proteínas del complemento a inmunocomplejos antígeno-anticuerpo produce su degradación y posterior fagocitosis.

1.2 Activación del Complemento

El complemento puede activarse a través de 3 vías, la vía clásica, CP (del inglés, *Classical Pathway*), de las lectinas, LP (del inglés, *Lectin Pathway*) y la vía alternativa, AP (del inglés, *Alternative Pathway*). La CP y la LP comparten la cascada de activación, aunque se activan mediante estímulos diferentes. La CP se activa mediante un complejo antígeno-anticuerpo, mientras que la LP es activada por residuos de manosa presentes en la superficie de algunos patógenos. La AP por su parte se encuentra constitutivamente activa a un nivel basal muy bajo. Las tres vías convergen en la activación de la proteína C3 (**Fig. 1.1**), cuando este sufre un proceso de hidrólisis que genera C3b, el cual puede unirse ahora a las superficies tanto de células propias como patógenos, actuando como molécula señalizadora para la activación del complemento y el paso a la vía lítica que genera un complejo de ataque a membrana y termina por eliminar a la célula.

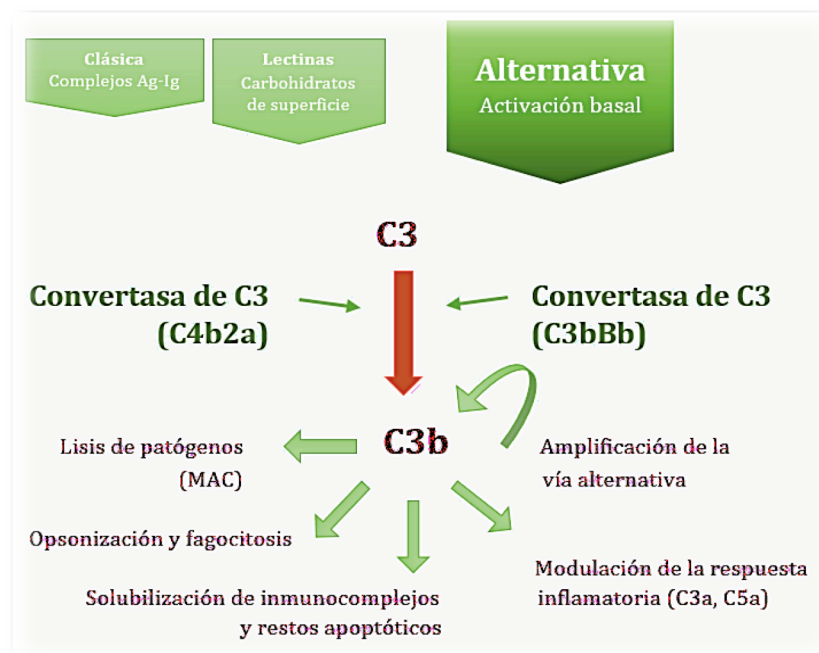


Fig. 1.1 Esquema de activación y funciones del complemento. Las tres vías convergen en la formación de la convertasa de C3, C4b2a en CP y LP, y C3bBb en AP. La activación de C3 a C3b provoca un bucle de amplificación que conduce a la formación de más convertasa de C3, lo que conduce a las diferentes funciones del complemento.

1.2.1 Vías de Activación

- **Vía Clásica (CP)**

Fue la primera vía que se descubrió. La activación de esta vía se inicia mediante la generación de inmunocomplejos entre IgGs o IgMs y C1. Este complejo está formado por la proteína globular C1q y dos serín-proteasas C1r y C1s. La unión de C1q a la región Fc de al menos dos anticuerpos, provoca la activación de C1r y C1s, y la escisión de C4 en C4a y C4b. C2 se une a C4b, anclado en la superficie, y en este paso C1s escinde C2a para formar la convertasa de C3, C4bC2a, y liberar el fragmento C2b. C4bC2a activa sucesivas moléculas de C3, generando C3b, que al igual que C4b, expone un grupo tioéster reactivo que le permite unirse a la superficie, y asegura la amplificación del complemento hacia la vía lítica (Ricklin D, 2010) (**Fig. 1.2**).

- **Vía de las Lectinas (LP)**

La activación de esta vía se produce sin la mediación de anticuerpos, cuando una proteína de unión a manosa MBP (del inglés, *Manose Binding Protein*) se une a algún polisacárido microbiano como lectina o bien a IgAs, y activan C4 para formar la convertasa de C3. Estas MBP circulan en el suero asociadas a proteínas de unión a manosa MASP1, MASP2 y MASP3, unas serín-proteasas equivalentes a C1r y C1s de la CP. El reconocimiento y la unión a estas glicoproteínas induce cambios conformacionales en estos complejos permitiendo la unión de MASP2, y provocan que C4 y C2 se hidrolicen, formándose la convertasa de C3 y C5 igual que en la CP (Muller-Eberghard, 1988) (Ricklin D, 2010) (**Fig. 1.2**).

- **Vía Alternativa (AP)**

La AP del complemento es la vía filogenéticamente más antigua a pesar de ser descubierta posterior a la vía clásica. La AP se encuentra constitutivamente activa mediante un mecanismo de *tick over*, que provoca la activación espontánea de C3 a C3b a muy bajo nivel y favorece una rápida respuesta del sistema del complemento y la inmunidad innata (Pangburn RD, 1981). Este proceso espontáneo se produce cuando la molécula de C3 sufre un cambio conformacional que expone un enlace tioéster y se hidroliza formando C3-H₂O, que actúa, estructural y funcionalmente, de igual manera que

C3b (Muller-Eberhard, 1988). Así pues, si la activación de la AP se genera en el plasma estas proteínas se inactivarán rápidamente para evitar daño tisular.

Si la activación se produce sobre la superficie de patógenos, C3 sí puede activarse a C3b. En este caso C3 sufre varios cambios conformacionales en su activación hacia C3b, que ahora puede unirse a factor B (fB) presente en plasma. fB puede unirse a moléculas de C3b generadas previamente por la convertasa de C3, formando una pro-convertasa C3bB, que otra serín-proteasa factor D (fD) puede activar, cortando proteolíticamente a fB para generar la convertasa de C3 de la AP, C3bBb. Esta nueva convertasa genera más C3b, que junto al C3b generado por la CP y la LP, pueden ensamblar más convertasas, generando un bucle de retroalimentación positiva que amplifica rápidamente la respuesta. (Pangburn, *et al.*, 1986) (**Fig. 1.2**).

La presencia de glicoproteínas y glicolípidos patógenos aceleran la activación de esta vía, y proteínas plasmáticas como properdina estabilizan estas convertasas favoreciendo la activación sobre superficies extrañas (**Fig. 1.2**).

1.2.2 Vía Lítica o Terminal de confluencia de las 3 vías

Las tres vías de activación del complemento convergen en la formación de la convertasa de C5, que provoca la hidrólisis de C5 en el fragmento C5b, que se une a la superficie celular (Muller-Eberhard, 1986), y además genera un pequeño fragmento C5a, que junto a C3a, actúan como potentes anafilotoxinas. La generación de C5b activa un proceso de ensamblaje de los componentes finales del complemento, como son C6, C7, C8 y C9, y que conforman un complejo multiproteico llamado complejo de ataque a membrana MAC (en inglés, *Membrane Attack Complex*) (Rawal N, *et al.*, 2001).

El primer complejo que se forma es C5b6, sin actividad catalítica, que se une débilmente a la membrana. La unión de C7, que posee un dominio hidrofóbico, confiere a este complejo una unión a membrana mucho más potente. Cuando C8 se une al complejo se forma C5b-8 que actúa como receptor de una serie de moléculas de C9. C9 polimeriza y genera el MAC que abre un poro en la membrana de 30 nm y como resultado, provoca la lisis osmótica de la célula o del patógeno (**Fig. 1.2**).

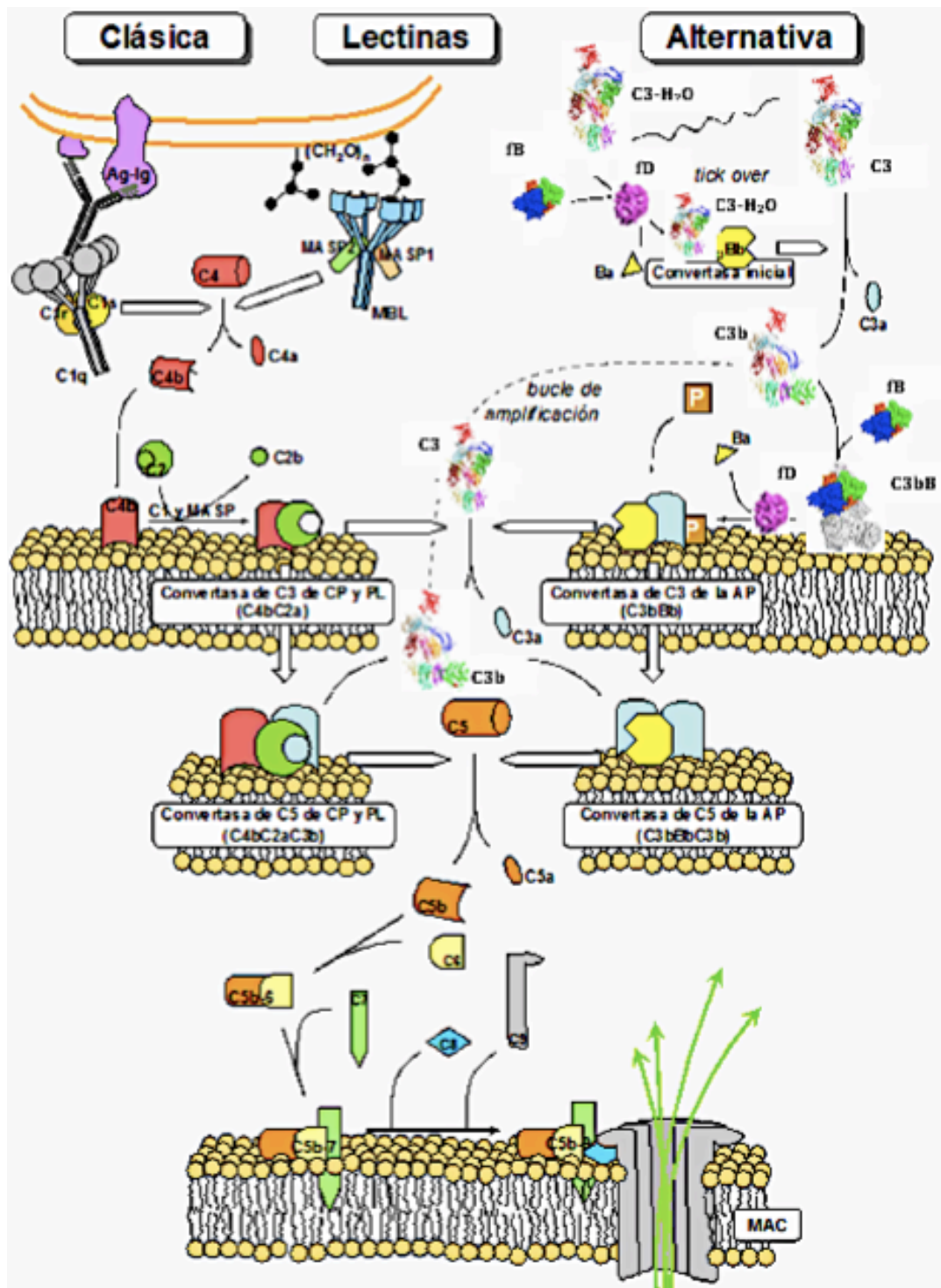


Fig. 1.2 Vías de activación del complemento. La CP se inicia por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ig). La LP reconoce carbohidratos de superficie $(CH_2O)_n$. La AP se encuentra constitutivamente activa gracias al mecanismo de *tick over*, que genera una convertasa en fase fluida de manera espontánea. Las tres vías convergen en la hidrólisis de C3 por las convertasas de C3 generando C3b, que forma parte de la convertasa de C3 de la AP, dando lugar a un bucle de amplificación de la activación de esta vía. El C3b depositado junto a las convertasas de C3 genera las convertasas de C5. La hidrólisis de C5 inicia la vía terminal, que desencadena en la formación del MAC que provoca la lisis osmótica en el patógeno. Imagen adaptada del Dr. Agustín Tortajada Alonso.

1.3 Estructura de las proteínas del complemento

1.3.1 Estructura de C3 y C3b

C3 es el principal activador de la AP y la molécula más abundante del complemento, presente en el plasma a una concentración en torno a 700-1200 $\mu\text{g/ml}$. Es una proteína globular de 186 kDa que se transcribe a partir de un gen de 41 exones, como un único ARN mensajero. C3 se traduce como una sola cadena peptídica y, tras un corte, se genera la molécula madura formada por dos cadenas peptídicas α y β , de 110 y 75 kDa respectivamente, unidas por puentes disulfuro (Janssen, *et al.*, 2005) (**Fig. 1.3**). La activación de C3 se produce cuando se expone y se muestra accesible un grupo tioéster interno, muy reactivo con nucleofílicos tales como grupos hidroxilo o amino. Como resultado de esta reacción se genera una unión covalente a través de un enlace éster o amida sobre las superficies adyacentes (Gros P, *et al.*, 2008). Las cadenas α y β de C3 se organizan en 14 dominios diferenciados (**Fig. 1.3**). Estas dos cadenas se disponen en un anillo de 8 dominios macroglobulina (MG1-MG8), que conforma el núcleo estructural. En la región N- terminal de la cadena α , un dominio anafilotoxina (ANA), que genera C3a, y se libera tras el corte proteolítico de C3 a C3b. La escisión de este fragmento expone el dominio α -NT, que en esta conformación es funcional en C3b. (Gros P, *et al.*, 2008). El dominio MG6 contiene un conector (LNK). Además, un dominio denominado CUB (*complement C1r/C1s*, VEGF, BMP1) conecta el anillo MG con un dominio que contiene el enlace tioéster (TED). En la región C-terminal de la misma cadena se sitúa el dominio C345C (*complement C3, C4 and C5 C-terminal*) (Janssen BJ, *et al.*, 2006), (Wiesmann, *et al.*, 2006).

Las estructuras a resolución atómica de C3 y C3b de la especie humana se han resuelto mediante cristalografía de rayos X, lo que ha ayudado a comprender los cambios conformacionales que sufre la molécula de C3 tras su activación a C3b (Janssen BJ, *et al.*, 2005), (Janssen BJ, *et al.*, 2006), (Forneris F, *et al.*, 2016). El fragmento C3a, dominio (ANA), se encuentra estabilizando la molécula de C3 en su forma nativa, y tras su liberación, con la consecuente exposición del extremo α -NT, causa una serie de cambios conformacionales característicos de la forma funcionalmente activa, C3b. Algunos de estos cambios se producen a nivel de los dominios MG7-MG8, C345c, y el α -NT, aunque el cambio más importante es la exposición del grupo tioéster, que se

produce por un desplazamiento del módulo CUB-TED hacia la parte inferior de la molécula, alejándose del anillo de MGs (**Fig. 1.3**).

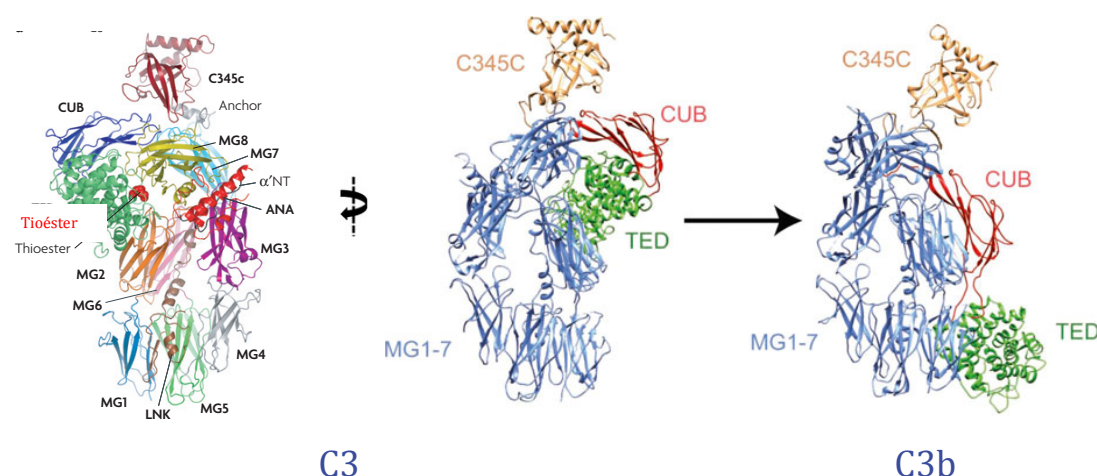


Fig. 1.3 Estructura de C3 y C3b. A la izquierda, estructura 3D de C3, detallando cada uno de los 14 dominios de C3. Los residuos que configuran el grupo tioéster (en rojo) están situados en el diagrama. En el centro, otra vista estructural a resolución atómica de C3 (PDB ID 2A73) (Janssen BJ, *et al.*, 2005). A la derecha C3b (PDB ID 2I07) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) tras su activación por la convertasa de C3 y liberación del fragmento ANA/C3a. El cambio estructural más importante se da a nivel del dominio TED, y también en los dominios CUB y C345c. Adaptada de (Gros P, *et al.*, 2008).

1.3.2 Estructura de iC3b

El corte de C3b y su inactivación para generar iC3b lo produce la serín-proteasa factor I (fI), que requiere la presencia de cofactores. En un primer paso se producen dos cortes en el dominio CUB de la cadena α , que generan iC3b y libera un pequeño fragmento de 17 aminoácidos C3f (**Fig. 1.4**). El factor H (fH) es cofactor para fI si el corte se produce en fase fluida y MCP (del inglés, *Membrane Cofactor Protein*) cuando el corte se realiza en superficie. Si actúa CR1 (del inglés, *Complement Receptor 1*) como cofactor se puede producir otro corte adicional, este más lento, que genera un fragmento soluble en plasma C3c, y otro anclado en la superficie C3dg, que incluye el dominio TED (**Fig. 1.4**). Aunque la conversión de C3b a iC3b interrumpe la amplificación del complemento, también genera sitios de unión específicos para receptores del complemento (CRs) que llevan a cabo varias de las respuestas inmunitarias mediadas por iC3b.

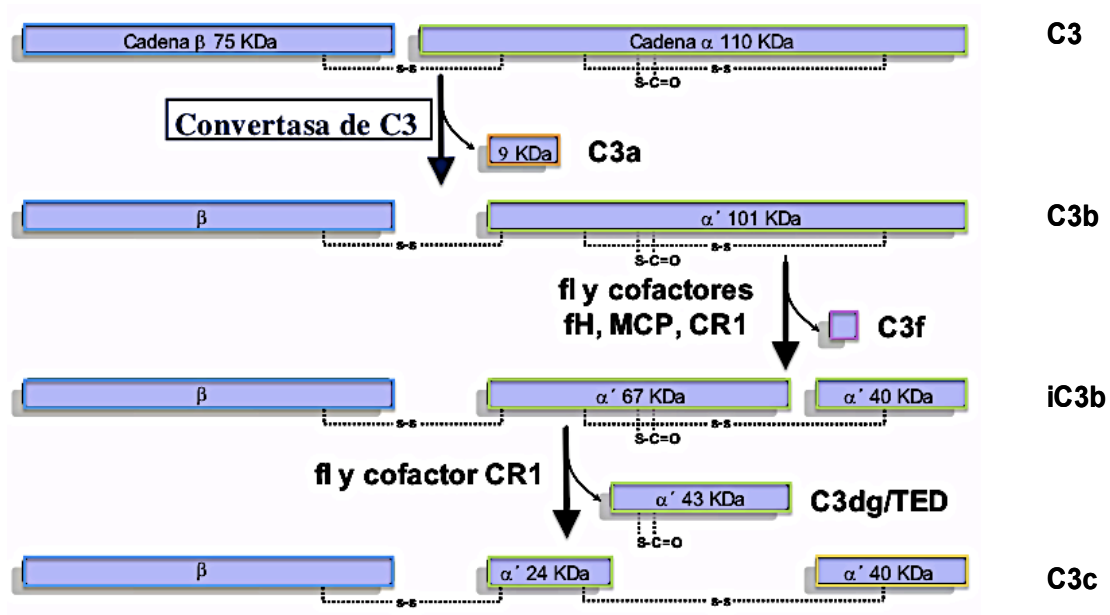


Fig. 1.4 Activación de C3 y productos de degradación. La convertasa de C3 genera dos moléculas, C3a y C3b. C3 está compuesto por dos cadenas, α y β , unidas por un puente disulfuro. Los sucesivos cortes producidos sobre la cadena α generados por fi en presencia de los cofactores adecuados, fH MCP o CR1, generan los diferentes productos de degradación.

La molécula de iC3b ha presentado históricamente cierta controversia sobre su estructura 3D (Isenman DE, 1983). Uno de los objetivos principales de este trabajo será dilucidar esta cuestión incrementando el conocimiento estructural del complemento, su interacción con otros receptores del complemento (CR) y su regulación.

1.3.3 Estructura de factor B (fB) y Triada Catalítica

El factor B (fB) es una serín-proteasa de elevada especificidad que circula en plasma en forma de proenzima con un tamaño de 90 kDa. fB se corta por la proteasa fD en dos fragmentos Ba y Bb. En su forma activa cataliza el paso central de amplificación de la activación del complemento en la hidrólisis de C3 o C5. fB consta de 5 dominios, 3 de los cuales son SCR (del inglés, *Short Consensus Repeats*) situados en el N-terminal y que forman la parte no catalítica, Ba. Tras un conector (*linker*) de 45 aminoácidos se sitúa Bb, que consta de un dominio vWA (Von Willebrand tipo A) y un dominio SP serín-proteasa,

que incluye el centro catalítico (**Fig. 1.6**) (Milder FJ, *et al.*, 2007). La activación de fB se realiza en dos pasos:

1. **fB se une a C3b para formar la pro-convertasa C3bB.** En esta unión interaccionan los SCRs de Ba y es dependiente de Mg^{2+} a través del sitio MIDAS (del inglés, *metal ion-dependent adhesion site*) que se encuentra en el dominio vWA de Bb.
2. **Proteólisis y liberación del fragmento Ba.** Sobre el complejo se expone la zona del conector que es reconocida por fD, que provoca un corte proteolítico y libera el fragmento Ba, para generar la convertasa activa C3bBb (Pangburn, *et al.*, 1986).

En estudios donde se ha resuelto la estructura atómica de fB ha sido posible conocer más en detalle el proceso de activación de fB (Milder FJ, *et al.*, 2007), aunque estos todavía se presentan incompletos a la hora de conocer el mecanismo exacto de activación de la convertasa de C3, C3bBb. Lo que sí parece ya comprobado es el cambio en el sitio MIDAS para que, en presencia de Mg^{2+} , se pueda unir a C3b, y a su vez quede expuesta la región conectora o *linker*, para que pueda ser cortada por fD.

Los dominios SCR de Ba se disponen próximos a Bb, y la hélice αL del conector (*linker*) se sitúa dentro del dominio vWA, ocupando el sitio de la hélice $\alpha 7$. Tras la unión con C3b y corte por fD se libera Ba, y $\alpha 7$ ocupa el lugar de αL en el dominio vWA adoptando así la conformación catalíticamente activa. En este punto el dominio catalítico SP se reorienta y aunque presenta la misma conformación en fB y en Bb, sí que se activa por la unión al sustrato (Gros P, *et al.*, 2008). (**Fig. 1.5**)

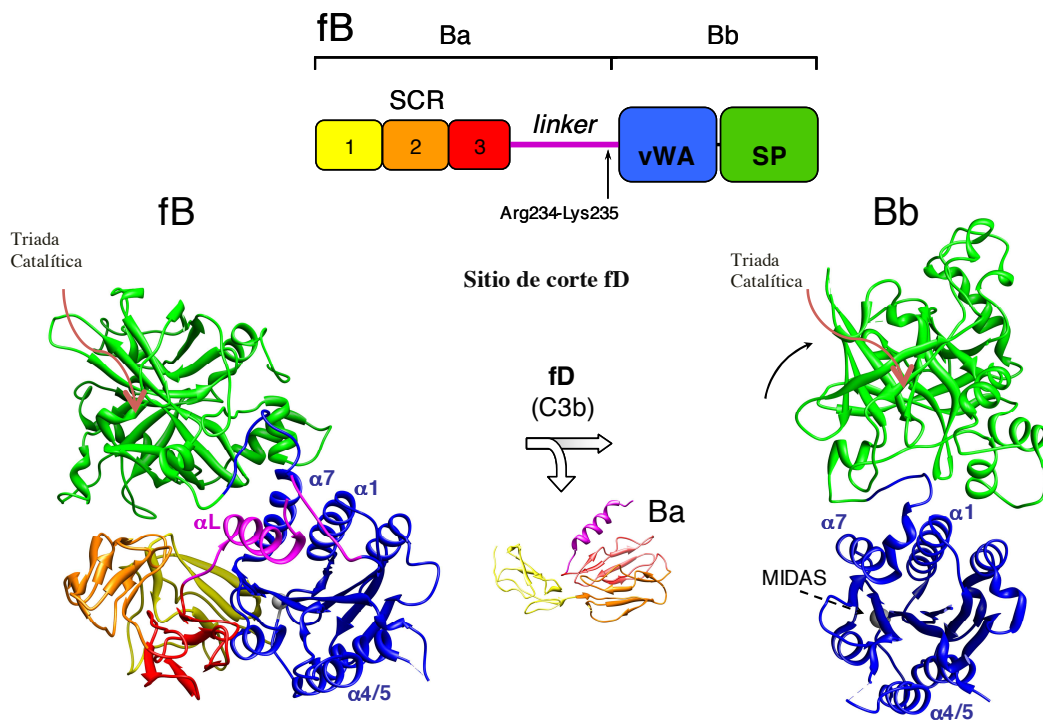


Fig. 1.5 Estructura de factor B. En el panel superior se muestra un diagrama con cada uno de los dominios de fB y el sitio de corte para fD. En el panel inferior, la estructura atómica de fB (**PDB ID 2OK5**) en solución y el fragmento Bb (**PDB ID 1RRK**). Figura adaptada del Dr. Agustín Tortajada.

- **Triada Catalítica**

El dominio SP de fB contiene un pliegue o bolsillo típico muy parecido al de otras serín proteasas como la quimotripsina. El centro catalítico en las serín proteasas consiste en una tríada catalítica compuesta por una Serina (Ser, S) que actúa como nucleófilo, histidina (His, H) (base), y ácido aspártico (Asp, D), que requieren de un ataque nucleofílico en el sustrato y un bolsillo que ayuda a la estabilización del intermediario de reacción. Estos residuos actúan en una serie de pasos, intercambiando las cargas que hacen activar y polarizar al nucleófilo que ataca al sustrato, formando un intermediario covalente que es posteriormente hidrolizado para regenerar la enzima (**Fig. 1.6**). El residuo ácido, Asp, alinea y polariza la base His, la cual a su vez activa al nucleófilo Ser. La configuración de la tríada reduce el pKa del nucleófilo, que ataca al sustrato. El bolsillo cargado positivamente en el esqueleto amida estabiliza el aumento de carga en el estado de transición del sustrato.

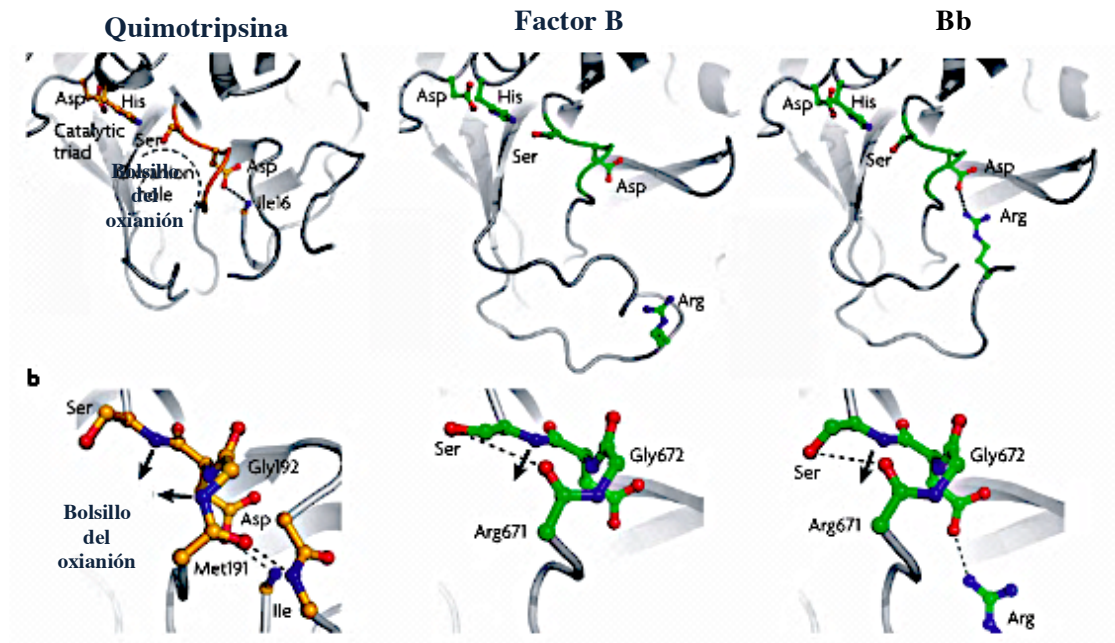


Fig. 1.6 Centro catalítico de quimotripsina, factor B y Bb. En (a), Comparación estructural de quimotripsina, fB y Bb. En el paso de activación de fB a Bb, una arginina localizada en un bucle de superficie actúa de manera similar a como lo hace el N-terminal (Ile16) en quimotripsina. El bolsillo de fB y Bb es similar y además Bb tampoco presenta una conformación totalmente activa por sí mismo. En (b), dos amidas forman un bolsillo activo en quimotripsina (flechas azules), mientras que en fB y Bb solo presenta una amida. Es posible que la unión del sustrato (C3) puede inducir la maduración del bolsillo en Bb, cuando forma parte del complejo C3bBb. Figura adaptada de Gros P, *et al.*, 2008.

1.3.4 Regulación de la Vía Alternativa del Complemento

Las funciones efectoras del complemento, induciendo inflamación y lisis, contribuyen al control de la infección y son por tanto una primera línea de defensa frente a la invasión microbiana. A pesar de que una respuesta desproporcionada puede desembocar en daño orgánico y patología, la activación del complemento se encuentra estrictamente controlada por un número de proteínas reguladoras, tanto solubles como asociadas a membrana. Factor H (fH), factor de aceleración de la disociación (DAF) (del inglés, *Decay-accelerating Factor*), proteína cofactora de membrana (MCP), y receptor de complemento tipo 1 (CR1), que disocian las convertasas de C3/C5, funcionan como cofactores para el factor I (fI), y median la proteólisis de C3b (Gros P, *et al.*, 2008), (Rodríguez de Córdoba S, *et al.*, 2011) (**Fig. 1.7 y Fig. 1.9**).

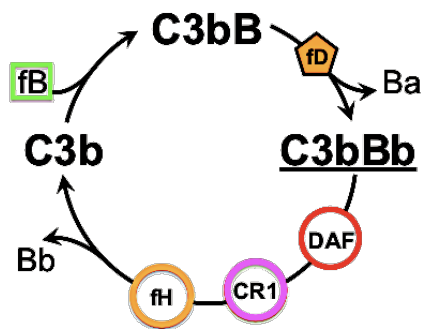


Fig. 1.7 Reguladores de la convertasa de C3. Los reguladores fH, DAF y CR1 aceleran la disociación de la convertasa C3bBb. El C3b que se disocia puede volver a formar una nueva convertasa, amplificando el bucle.

C3b reconoce e interacciona con estos reguladores de complemento, como fH, el regulador prototípico de la AP, que consiste en una cadena polipeptídica de 20 SCRs (del inglés, *Short Consensus Repeats*) (Rodríguez de Córdoba S, *et al.*, 2011), (Lea SM, *et al.*, 2012). fH se une a C3b, acelera el decaimiento de la convertasa de C3 de la AP y actúa como cofactor para el factor I (fI) mediando la inactivación proteolítica de C3b que genera iC3b. C3b se une a fH a través de SCR1 a SCR4, como la revelada en la estructura cristalina de C3b unido a los primeros 4 SCRs en fH (**Fig. 1.8**) (Alcorlo, *et al.*, 2015), y esta interacción de fH es esencial para el decaimiento y la actividad cofactora de fI. SCR1 y SCR2 en fH contactan con la región α' N-terminal y el dominio MG7 en C3b. SCR3 une el dominio CUB y SCR4 interacciona con el MG1 y el TED (Wu J, *et al.*, 2009). Por lo tanto, la interacción entre el TED y el dominio MG1 en C3b es importante para el reconocimiento de fH, y se piensa que también podría serlo para MCP, DAF y CR1 (Rodríguez de Córdoba S, *et al.*, 2011), (Lea SM, *et al.*, 2012). Asimismo, SCR19 y SCR20 en fH contienen un sitio de unión en C3b (poli-anión) implicado en prevenir la activación de la AP en células propias. En conclusión, al mismo tiempo que la activación de C3 para generar C3b permite la formación de la convertasa de C3 y dispara el bucle de amplificación, y también genera la forma para ser regulada.

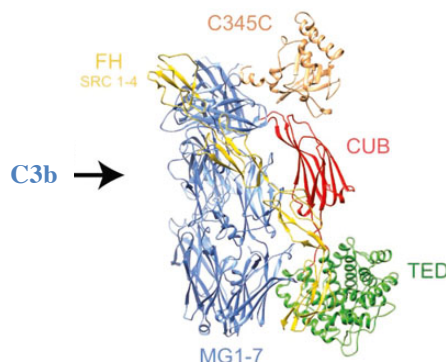


Fig. 1.8 Estructura de C3b en complejo con el regulador fH. Se muestra la estructura de C3b con fH (1-4)(amarillo). (Wu J, *et al.*, 2009)

A pesar de que la proteólisis de C3b mediada por fI preserva la homeostasis del complemento, los productos de degradación de C3b, iC3b y C3dg son también moléculas activas que interaccionan con receptores situados en leucocitos y son primordiales a la hora de modular las respuestas inmunitarias y ser diana de patógenos para producir el aclaramiento durante la fagocitosis de los mismos.

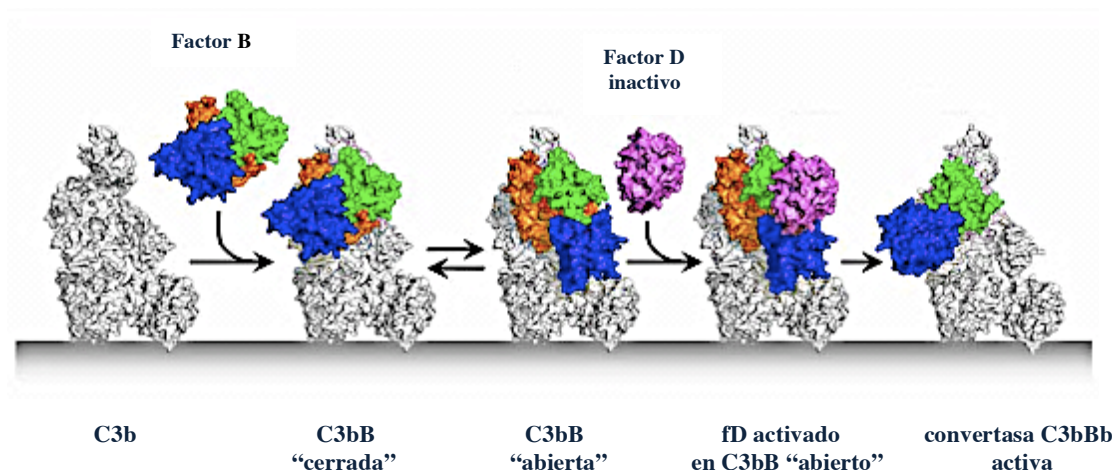


Fig. 1.9 Representación estructural de la formación y activación de proconvertasas de la vía alternativa. (Izquierda, mostrado en gris) C3b unido a superficie recluta fB para formar la proconvertasa C3bB, la cual muestra un equilibrio dinámico entre la forma abierta y cerrada. fD (violeta) se une específicamente a la conformación abierta de la proconvertasa, activándola y cortando fB. Después de la liberación del propéptido Ba (naranja), un cambio conformacional unido a C3b, genera la convertasa C3bBb (derecha). Adaptado de (Forneris F, *et al.*, 2010).

CR2 (CD21) une iC3b y C3dg, incrementando la inmunidad de células B (Weis JJ, *et al.*, 1984), (Matsumoto AK, *et al.*, 1991). De manera similar, CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) reconocen iC3b y disparan la fagocitosis. Asimismo, CR3 y CR4 también poseen funciones en la migración y tráfico de leucocitos, formación sináptica, y coestimulación (Ricklin D, *et al.*, 2010), (Ross GD, 2000). Otra característica de C3b e iC3b es su capacidad de unión a una superfamilia de Ig descrita recientemente (CRIg), que contribuye al aclaramiento de patógenos y células apoptóticas. La expresión de CRIg está restringida a un subconjunto de macrófagos residentes en tejido (Helmy KY, *et al.*, 2006). La unión de CRIg a C3b también inhibe la actividad convertasa C3/C5 (Wiesmann C, *et al.*, 2006). En la **Figura 5.7** (Discusión) se presenta con mayor detalle estas interacciones entre C3b y sus reguladores.

1.4 MET y reconstrucción 3D de partículas individuales

La microscopía electrónica de transmisión (**MET**) (Bozzda J, *et al.*, 1992), (Stahlberg H, *et al.*, 2008) es una de las técnicas más potentes y con mayor potencial de desarrollo en la determinación de la estructura de macromoléculas debido al desarrollo de microscopios y detectores cada vez más potentes y precisos (Orlova, *et al.*, 2011), (Llorca O, 2005). Mediante el uso de técnicas de reconstrucción de partícula individual, hoy en día es capaz de llegar a resolución atómica (Yu X, *et al.*, 2008), (Zhang X, *et al.*, 2008) tal como lo hacen la Cristalografía de Rayos X y la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) pero sin presentar los inconvenientes y limitaciones de estas técnicas estructurales.

En la Cristalografía de Rayos X, la principal limitación es la obtención de cristales con una alta calidad, concentración y pureza de la muestra (Berger J, 2008). Otra importante limitación es relativa al tamaño de la molécula, problema que comparte la RMN, puesto que, a mayor tamaño, mayor es la complejidad de los espectros de difracción y resonancia obtenidos.

La ME se encuentra limitada en su resolución (Lander G, *et al.*, 2012). Las aberraciones en las lentes, el bajo contraste de las imágenes, el daño de radiación y las técnicas de preparación de la muestra provoca que la resolución atómica teórica sea difícil de conseguir. No obstante, el desarrollo de la instrumentación y los métodos, junto al avance en la capacidad de computación y software ha acercado este límite (Fernandez-Leiro, *et al.*, 2016). La ME presenta como ventaja frente a estas técnicas que emplea una menor cantidad de muestra, no es necesario altas concentraciones de la misma para su análisis, y se pueden utilizar en un amplio rango de disoluciones. Asimismo, el tamaño de la muestra no es una limitación tan importante, ni tampoco el que la muestra pueda ser homogénea o formada por dos o más macromoléculas (Wilhelm R, *et al.*, 2012).

1.4.1 El microscopio electrónico de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión se puede descomponer en 4 partes principales. Una fuente de emisión, una columna de aceleración de electrones, lentes

electromagnéticas y un sistema de detección. La fuente de iluminación es un filamento o cátodo, generalmente Tungsteno, Wolframio o Hexaboruro de Lantano (LaB_6) del cual se extraen electrones y se aceleran por la acción de un elevado voltaje, entre 80kV y hasta 400kV. Para conseguir un haz centrado de electrones se emplean lentes condensadoras, y mediante bombas de alto vacío se evita que los electrones choquen con el aire contenido en la columna. De este modo los electrones pueden atravesar la columna sin desviarse, y consiguen interaccionar con la muestra.

La muestra depositada en una rejilla de ME se introduce en la columna mediante un brazo que se sitúa en la trayectoria del haz de electrones, que al incidir en la muestra se desvían y se recogen en un sistema de detección. La imagen que se genera se toma como una proyección de la muestra de estudio (Milazzo AC, 2005). Hace años se utilizaba una placa fotográfica para tal fin, que se substituyó por una cámara digital CCD (del inglés, *Charge-Coupled Device*). Actualmente el empleo de detectores directos (Fernandez-Leiro, *et al.*, 2016) con chips que poseen mayor resistencia a la radiación de electrones ha mejorado la eficiencia en la detección, y como consecuencia, ha revolucionado la ME.

1.4.2 Preparación de muestras para ME

El objetivo principal a la hora de preparar las muestras en ME es el de preservar la muestra de la radiación electrónica y del alto vacío dentro del microscopio electrónico. Hay dos técnicas principales, la tinción negativa (Ohi, *et al.*, 2004) y la Ultracongelación o Criomicroscopía Electrónica (Dubochet, *et al.*, 1988).

- **Tinción Negativa**

La tinción negativa se basa en reemplazar la solución de la muestra por una sal de metal pesado, como las sales de Uranilo, acetato y formiato principalmente, que consigue aumentar el contraste. Esta forma una matriz amorfa que ayuda a proteger la muestra de la radiación. La ventaja principal de esta técnica es que es sencilla de llevar a cabo y se puede aplicar a muestras heterogéneas y de muy diverso tamaño. La desventaja es que limita la resolución al tamaño de la sal de metal pesado empleada en la tinción en torno a 20 Å (Fig. 1.10).

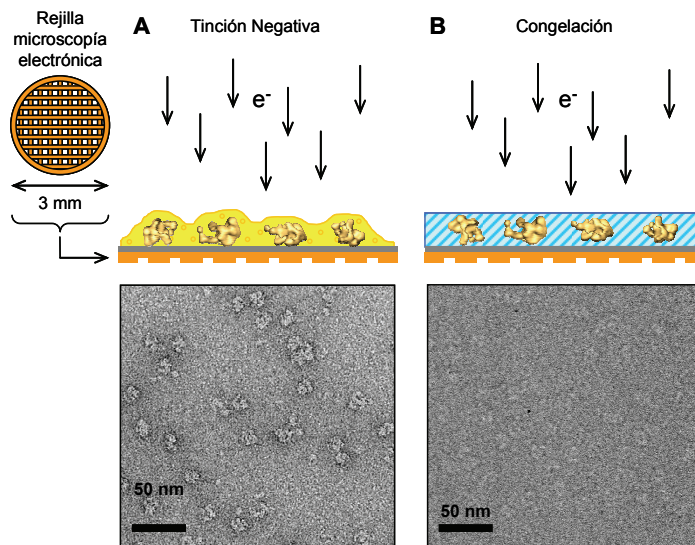


Fig. 1.10 Técnicas de preparación de muestras para ME.

(A) En la tinción negativa el espécimen queda embebido en una matriz amorfa que sustituye al tampón de la muestra. (B) En la criomicroscopía las partículas se congelan atrapadas en una fina capa de hielo vítreo que preserva su conformación nativa.

- **Crio-microscopía Electrónica**

En la crio-microscopía electrónica la muestra se encuentra embebida en su propio tampón a $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, que se consigue empleando N_2 líquido. La congelación es muy rápida y consigue que el agua presente en la muestra forme hielo vítreo, evitando la formación de cristales que provocarían un daño importante en la muestra. Mediante esta técnica se consigue que la muestra se preserve del daño provocado por la radiación, aunque las imágenes que se obtienen presentan un bajo contraste. Este se puede incrementar cambiando el foco cuando se obtienen las micrografías. Mediante esta técnica se puede obtener resolución cuasi-atómica (Jiang W, *et al.*, 2005), (Baker L, *et al.*, 2010), (Fernandez-Leiro, *et al.*, 2016) (**Fig. 1.11**).

1.4.3 Adquisición de datos

La toma de micrografías se realiza mediante la técnica de “mínima dosis”, cuyo objetivo es limitar la radiación que incide sobre la muestra, minimizando el daño provocado por la dosis de electrones, que no debe sobrepasar los $10\text{ e}^-/\text{\AA}^2$, aunque más recientemente el empleo de pequeños fragmentos de vídeo en la adquisición, pueden soportar $20\text{-}30\text{ e}^-/\text{\AA}^2$. Antes de tomar la micrografía se ajustan previamente las

condiciones de toma de imágenes en un área próxima en la rejilla, y se exportan a la zona de interés (Williams, *et al.*, 1970). De este modo se obtienen imágenes a una magnificación de 50.000 aumentos, con gran parte de la información estructural preservada, aunque con una baja relación señal-ruido. Para estudios de partícula individual se obtienen numerosas micrografías y se asume que la muestra se dispone sobre la rejilla de manera aleatoria, aunque en ocasiones la partícula puede presentar vistas mayoritarias.

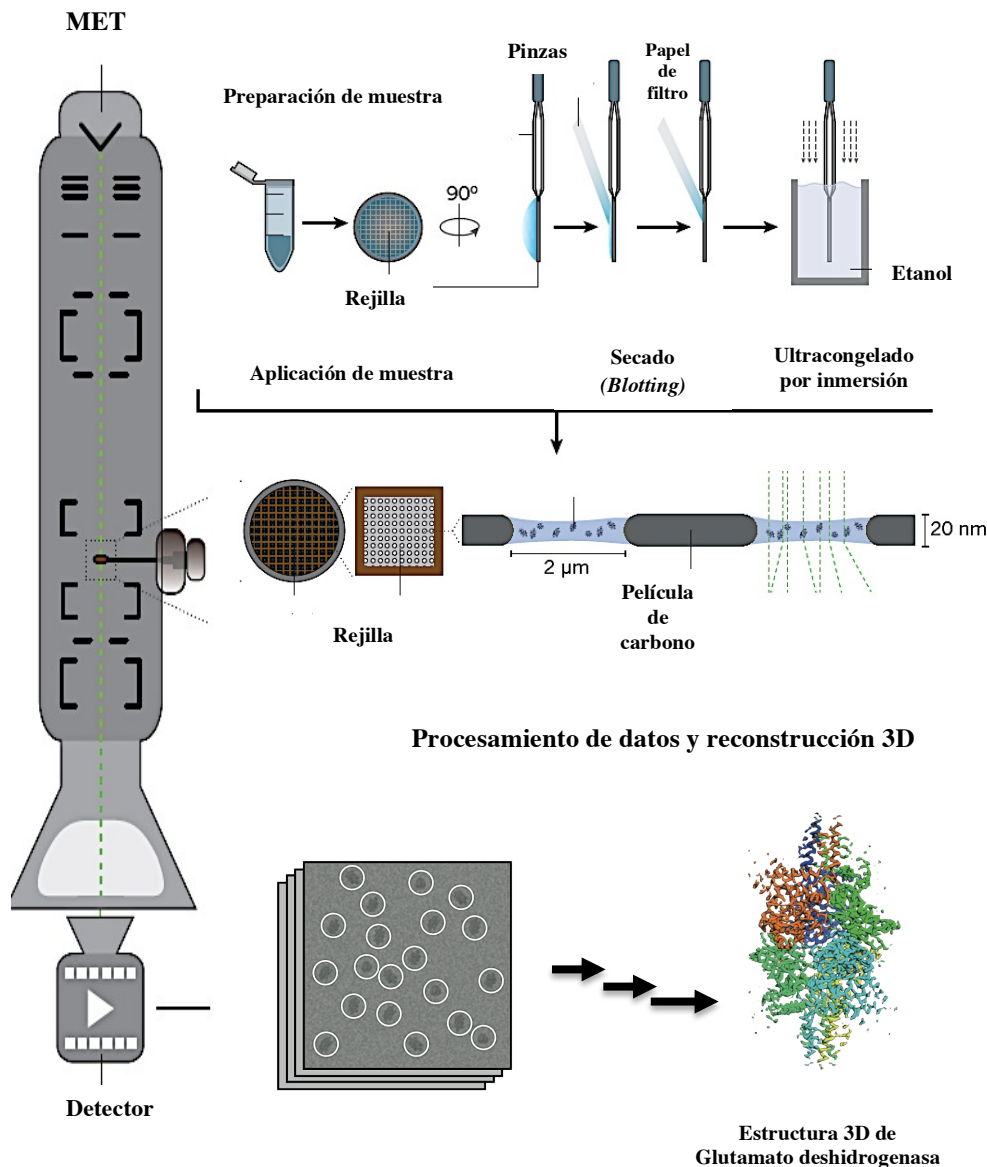


Fig. 1.11 Preparación de muestras y determinación de la estructura mediante Criome. La determinación de la estructura de la proteína a través de Criome implica varias etapas: preparación de la red de muestra, recolección de datos y procesamiento de datos seguida de reconstrucción 3D. La estructura de la enzima glutamato deshidrogenasa a una resolución de 1,8 Å es, hasta el día de hoy, la estructura a mayor resolución determinada a través de cryo-EM (Merk A, *et al.*, 2016). Adaptado de (Fernandez-Leiro, *et al.*, 2016).

1.4.4 Procesamiento de imagen

Para poder extraer toda la información estructural, es necesario utilizar el procesamiento de imágenes (Frank, 2006), que consigue seleccionar, y además alinear y clasificar todo el conjunto de imágenes. Los que se han utilizado para el desarrollo de esta tesis han sido los paquetes de EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999) y EMAN 2 (Ludtke, *et al.*, 2007) y XMIPP (Marabini, *et al.*, 1996; Sorzano, *et al.*, 2004), (Scheres S, *et al.*, 2006).

Se seleccionan de manera automática y se supervisa de manera manual miles de partículas individuales y se alinean y clasifican atendiendo a cada orientación de la molécula. De este modo podemos incrementar la relación señal-ruido.

1.4.5 Reconstrucción 3D

Para generar una estructura en 3D es necesario coleccionar un conjunto completo de vistas en 2D lo suficientemente amplio y detallado como para que contenga toda la información estructural de la molécula (Leschziner A, *et al.*, 2006). Hay que tener en cuenta que las imágenes tomadas en el ME son proyecciones 2D de la molécula observada en la dirección del haz de electrones. Determinando su relación angular (ángulos de Euler) se consigue completar la estructura 3D (Radon, 1917).

Para obtener un volumen inicial se puede reconstruir mediante el esquema del ángulo cónico, sobre todo cuando la muestra presenta vistas preferentes en la rejilla. Se obtienen para cada imagen dos vistas, una en el plano horizontal y otra inclinada unos 45°, aunque si bien hay una zona, llamada cono perdido, en la cual, la información estructural no se puede extraer. (Radermacher, *et al.*, 1987). Es necesario tener un amplio abanico de proyecciones 2D, a partir de medias 2D, que cubra la mayoría de orientaciones para obtener un mapa completo en 3D (Crowther, *et al.*, 1970).

A partir de un volumen inicial, la asignación angular puede resolverse empleando varias estrategias computacionales, y es recomendable utilizar varias de ellas para comparar los resultados y poder aprobar la estructura final. La reconstrucción angular se puede realizar por el método de líneas comunes, que, basándose en el teorema de la

sección central, determina la existencia de una línea común entre dos proyecciones en el espacio de Fourier (**Fig. 1.12**).

El modelo inicial se refina mediante un proceso iterativo que mejora la asignación de ángulos de Euler, hasta converger en la estructura final, que debe ser validada con la información biológica y estructural que de esa molécula o complejo se dispone.

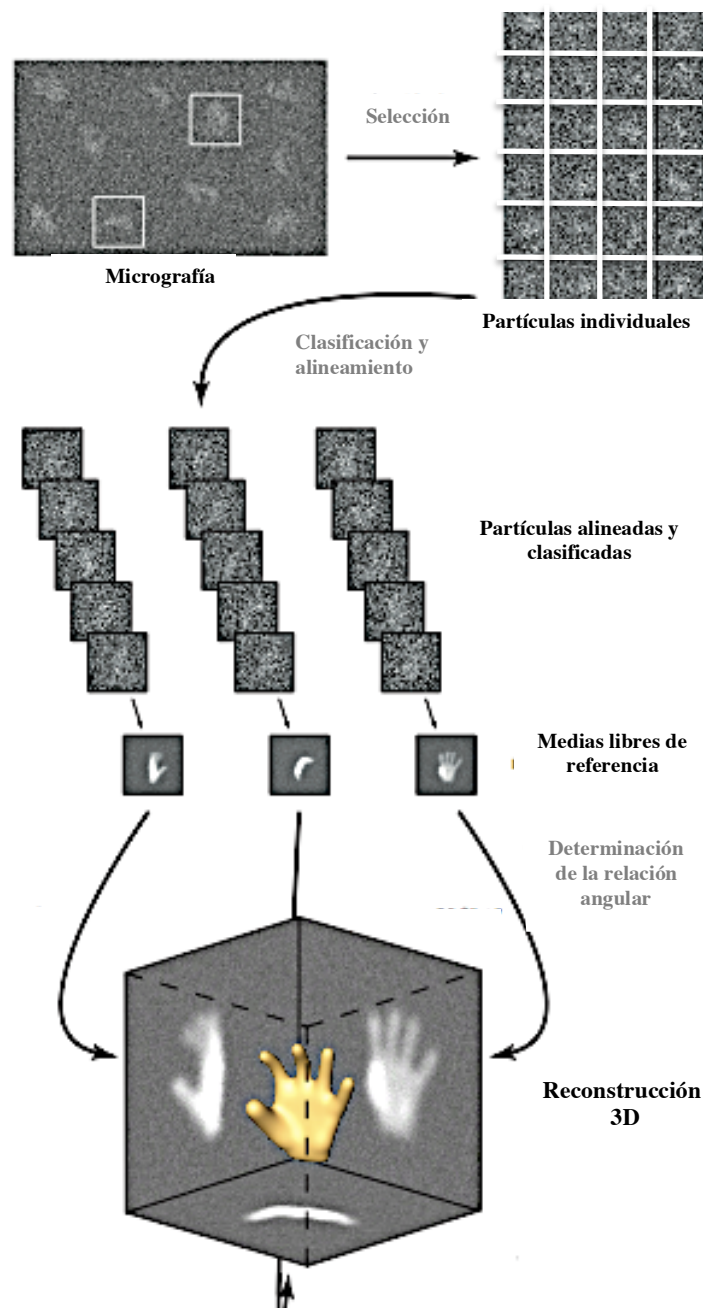


Fig. 1.12 Esquema del procesamiento de imágenes. Se ha empleado un mapa artificial de una mano para ilustrar el proceso. Las partículas individuales se extraen de las micrografías, alineadas, clasificadas y promediadas para aumentar la relación señal-ruido. El volumen 3D se obtiene tras determinar la relación angular de las partículas o de las medias correspondientes. Imagen cedida por el Dr. Ernesto Arias-Palomo.



2 Objetivos

El objetivo principal de esta tesis es avanzar en el conocimiento estructural y funcional de la vía alternativa del sistema de complemento, mediante un análisis estructural de proteínas del complemento, y de sus complejos con otros componentes y receptores del complemento. Este objetivo se pretende alcanzar mediante un conjunto de objetivos concretos que se detallan a continuación:

- Expresar y purificar varias de las proteínas del complemento.
- Estudiar la estructura de iC3b mediante microscopía electrónica 3D y caracterizar las bases estructurales de la interacción entre iC3b y sus receptores.
- Estudiar los cambios conformacionales que se producen en C3, C3b e iC3b y cómo estos afectan al reconocimiento específico por sus receptores.
- Purificar anticuerpos mAbs frente a fragmentos de C3 y generar los fragmentos Fab, comprobando que siguen conservando su inmunoreactividad.
- Caracterizar estructural y funcionalmente anticuerpos monoclonales (mAbs) frente a fragmentos de C3 generando sus correspondientes inmunocomplejos.
- Conocer con mayor detalle cómo el bloqueo mediado por los inmunocomplejos se puede utilizar para comprender mejor los mecanismos de formación de la convertasa de C3.



3 Materiales y Métodos

3.1 Proteínas del complemento de estudio

En la **Tabla 3.1** detallamos las diferentes proteínas que se han estudiado en esta tesis doctoral y algunas de sus características principales.

Proteína	Origen	Peso Molecular (kDa)	Cadenas	Fragmentos (kDa)
C3	Humano	187	α 113, β 75	
C3b	Humano	178	α' 104, β 75	
iC3b	Humano	176	α' 63 α'' 41, β 75	
fB	Humano Ratón	90		Bb (60), Ba (30)
fD	Humano	25		
Anticuerpos C3	Humano Ratón	158	Pesada 50, Ligera 25	Fab, Fc

Tabla 3.1 Proteínas del complemento estudiadas en este trabajo.

3.2 Amplificación del ADN por secuenciación y PCR

La reacción en cadena de la polimerasa ó PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se realizó con un ciclo de desnaturalización de 30 s a 95 °C, otro de anillamiento a 65 °C o bien a 72 °C durante 1 min y otro de elongación de 8 min a 72 °C para todos los amplicones, en 18 ciclos sucesivos, más un ciclo final de elongación de 10 min a 72 °C.

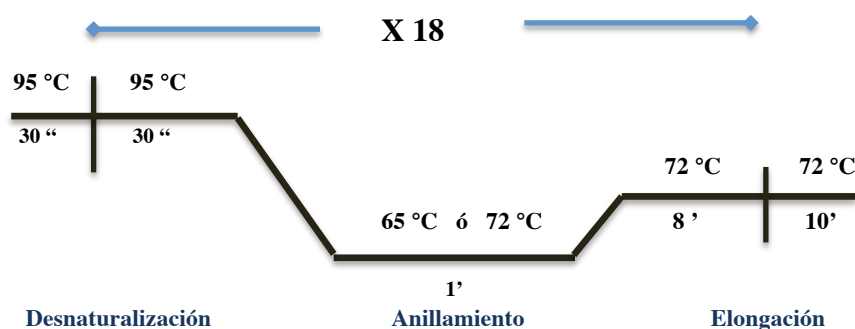


Fig. 3.1 Esquema de PCR de los exones de fB, de los diferentes mutantes catalíticos sobre fB y fBD279G.

Oligonucleótidos para la ampliación del ADN por PCR.

Región	Oligo Forward	Secuencia 5' a 3'	Oligo Reverse	Secuencia 5' a 3'	Tamaño (pb)
Exón 1-5	RT-FB-F1	CAAGCCAGGAC ACACCATC	RT-FB-R1	TCTTCCGCTTC TGTTGTTCC	1800
Exón 6-11	RT-FB-F2	TCATGTACGACA CCCCTCAA	RT-FB-R2	AGCTCTCGTGT CCCTTTGAA	2500
Exón 12-18	RT-FB-F3	ATAAGCCAGT CTCTGA	R: RT-FB-R3	CCTGTCCAAGC AGGAAACC	2000

Oligonucleótidos para la secuenciación.

Región	Oligo	Secuencia 5' a 3'
Exón 1 y 2	RT-FB-F1	CAAGCCAGGACACACCATC
Exón 3	FB-IVS2-F1	GTTTCTCAGTGACATGGTCT
Exón 4 y 5	RT-FB-R1	TCTTCCGCTTCTGTTGTTCC
Exón 6	RT-FB-F2	TCATGTACGACACCCCTCAA
Exón 7 y 8	FB-IVS8-R1	TATAGTGTTACAAGTGGACTTAAGG
Exón 9 y 10	FB-IVS8-F1	CTCAACTTGCTCACCCCTGC
Exón 11	RT-FB-R2	AGCTCTCGTGTCCCTTTGAA
Exón 12 y 13	RT-FB-F3	ATGAAAGCCAGTCTCTGA
Exón 14 y 15	FB-IVS13-F1	CAGACTATCAGGTGAGAGCGTC
Exón 16 y 17	FB-IVS17-R1	ACTAGCCACATGCATTGAGCT
Exón 18	FB-IVS17-F1	CTGATTCCCTTAGGTCAGCTAAG

Tabla 3.2 Oligonucleótidos empleados en la ampliación y la secuenciación del gen Fb.

F1: CAAGCCAGGACACACCATC
F2: TCATGTACGACACCCCTCAA
F3: ATGAAAGCCAGTCTCTGA
T3: ATTAACCCTCACTAAAGGGA

Tabla 3.3 Cebadores empleados en la secuenciación de fB

3.3 Plásmidos y construcciones

El cDNA de factor B fue clonado en el plásmido comercial pCI-Neo (*Promega*), para obtener una construcción **pCI-Neo-ADNc factor B D279G humano**, que incluía la mutación D279G.

3.4 Mutagénesis dirigida

Los experimentos de mutagénesis dirigida se realizaron con un kit comercial Stratagene (*Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit*) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los oligos empleados en la mutación se detallan en la tabla siguiente.

GEN	MUTACIÓN	OLIGO	SECUENCIA 5' a 3'
fB	fB D279G	FB-D279G-F FB-D279G-R	GGTGCTAGATGGATCAGGAAGCATT GGGGCCAGCAAC GTTGCTGGCCCCAATGCTTCCTGATC CATCTAGCACC

Tabla 3.4 Oligonucleótidos empleados en la mutagénesis dirigida de fB D279G.

His526Ala Fw	GCTGACAGCAGCAGCTTGTTCCTACTGTG
His526Ala Rev	CACAGTGAAACAAGCTGCTGCTGTCAGC
His526Arg Fw	GCTGACAGCAGCAGCTTGTTCCTACTGTG
His526Arg Rev	CACAGTGAAACAAGCTGCTGCTGTCAGC
Ser699Thr Fw	CTTGACAGAGGTGATGCTGGCGGCCCTTG
Ser699Thr Rev	CAAGGGGCCGCCAGTATCACCTCTGCAAG
Ser699Ala Fw	CTTGACAGAGGTGATGCTGGCGGCCCTTG
Ser699Ala Rev	CAAGGGGCCGCCAGCATCACCTCTGCAAG

Tabla 3.5 Cebadores (*primers*) empleados en la mutagénesis de los mutantes catalíticos a partir del mutante estructural de fB D279G.

3.5 Cultivos de células de mamífero

El cultivo de células de mamífero se utilizó para la expresión de los diferentes fB mutantes. Estos ensayos se realizaron en colaboración con el grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba (CIB-CSIC, Madrid).

3.5.1 Líneas celulares

Se utilizó la línea celular CHO (fibroblasto de ovario de hámster), que se cultivó en medio Ham's F12 (*Gibco*) complementado con 10% (v/v) suero fetal bovino (*Gibco*), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina y 2 mM L-glutamina (*Gibco*), a 37 °C, 95% de humedad y 5% CO₂.

3.5.2 Transfecciones transitorias

Para la expresión de proteínas, las células fueron transfectadas con Lipofectina (*Invitrogen*). Para conseguir una transfección satisfactoria se sembraron, 24 h antes, 500.000 células en 3 ml de medio completo por cada placa P60. Se emplearon 6 placas P60, 4 para los diferentes mutantes catalíticos, y dos placas como controles positivo y negativo con y sin ADN respectivamente. En un tubo eppendorf se incubaron a temperatura ambiente 20 µl (5 µg) de ADN total, 24 µl de lipofectina y 156 µl de medio de cultivo (sin suplementar). Tras 30 min completamos hasta 1 ml con medio. Antes de la transfección, las células se lavaron con 3 ml de PBS 1X y se añadieron 2,8 ml de medio (sin suero) en cada placa. Se incubó durante la noche a 37 °C, 95% de humedad y 5% CO₂, tras lo cual se volvieron a lavar y se les añadió medio completo. Finalmente, las células se centrifugaron, y se recogieron los sobrenadantes para valorar mediante ELISA la expresión de la proteína de interés.

3.5.3 .Transfecciones estables

Tras 24 h después de la transfección, se realizó la selección de células mediante su crecimiento en presencia del antibiótico G418 (0,5 mg/ml concentración final) (*Calbiochem*), para la generación de líneas celulares estables. De nuevo los sobrenadantes se testaron en ELISA para monitorizar los niveles de expresión de la proteína de interés.

3.6 Ensayos de ELISA

3.6.1 Protocolo general

La técnica de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) se utilizó para la detección de distintas proteínas del complemento, basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo y aprovechando la sensibilidad de las pruebas enzimáticas. En estos ensayos se utilizaron placas de 96 pocillos (*COSTAR*) que se incuban con 100 μ l de anticuerpo policlonal a una dilución 1:100 en NaHCO_3 0,1 M pH 9.5 durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se realizó un lavado con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y Tween20 0,2% (v/v)) y se saturó con 1% (p/v) BSA en tampón de lavado durante 1h a temperatura ambiente. Tras 3 lavados, se aplicaron las muestras preparadas previamente a la dilución adecuada en el tampón que contenía 1% (p/v) BSA, y se incubó durante 1h a temperatura ambiente. Después de 4 lavados se añadió el anticuerpo primario diluido en presencia de 1% (p/v) BSA y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. Después de otros 4 lavados, se incubó con el anticuerpo secundario durante 30 min a temperatura ambiente. Para revelar el ensayo, se diluyeron 4 pastillas del sustrato OPD (dihidrocloreuro o-fenilendiamina) (*Dako*) en 12 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7.6, al que añadimos 5 μ l de H_2O_2 al 30% (v/v). Finalmente se realizaron 5 lavados antes del revelado. La reacción se detuvo con H_2SO_4 0,1 M y se midió la absorbancia a 492 nm en un lector de placas de ELISA. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado, y se utilizaron diluciones seriadas de una muestra control de concentración conocida para la cuantificación de las proteínas.

3.6.2 Cuantificación de C3 humano

Se sembró la placa de ELISA a una dilución 1:1000 con un anticuerpo policlonal de cabra anti-C3 de ratón. Como anticuerpo primario se empleó un anticuerpo policlonal de conejo anti-C3 humano a una dilución 1:1000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (HRP) (*Dako*) a una dilución 1:1000.

3.6.3 Cuantificación de fB humano

La placa de fue sembrada a una dilución 1:1000 con el anticuerpo policlonal de cabra anti-factor B humano (NSC) (*New Scientific*). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-factor B humano a una dilución 1:4000. Como secundario se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRP) (*Dako*) a una dilución 1:1000.

3.6.4 Determinación del isotipo de anticuerpo

Para determinar el isotipo de cada uno de los anticuerpos de C3, se realizó un ELISA con anticuerpos secundarios frente a cada uno de ellos. Se incubó la placa de 96 pocillos toda la noche con los anticuerpos C3-12.2 C3-16.4 y C3-12.17, a una dilución 1:1000 empleando 2 µg/ml en 100 µl/pocillo. Los isotipos que se probaron fueron IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, kappa y lambda, empleando 5 µg/ml en 100 µl/pocillo y haciendo diluciones seriadas partiendo de 1:250 y 1:500.

3.6.5 Caracterización de la reactividad de los anticuerpos analizados

Se diseñó un ensayo ELISA directo para caracterizar la reactividad de los anticuerpos frente a diferentes fragmentos de C3. Para ello, sembramos la placa con las proteínas C3, C3b, iC3b o C3dg purificadas de origen humano y con C3 de ratón a 1 µg/ml ON a 4 °C en PBS pH 7,4. Tras bloquear con BSA 5% y realizar lavados, se incubaron los diferentes anticuerpos anti-C3 en diluciones seriadas (0,5 a 2 µg/ml). La detección se llevó a cabo con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP (1:1000).

3.7 Purificación de proteínas

3.7.1 Purificación de fB humano

La purificación de factor B se realizó a partir de plasma de pacientes o de voluntarios sanos. Se utilizó para ello una columna de sefarosa DEAE *Affi-Gel® Blue Gel* (DEAE, *Bio-Rad*) con un anticuerpo monoclonal anti-factor B humano unido de manera covalente (clon D2). El volumen aproximado de columna fue de 10 ml.

Se lavó la columna con 1 volumen de PBS, 1 ml de isotiocianato, y 1 volumen de PBS (1X) pH 7,3, 1 ml de glicina 100 mM pH 2,5 y finalmente 1 volumen de PBS. A continuación, se cargó la muestra, inyectando en la columna 500 ml de plasma. Se lavó con 2 volúmenes de tampón PBS, 1 volumen de tampón borato (0,1 M NaCl 0,5 M, pH 8), y finalmente PBS hasta alcanzar una línea base de la densidad óptica estable. La elución de las proteínas unidas a la columna se realizó con 1 ml de glicina 100 mM pH 2,5, seguido de tampón PBS, recogiendo fracciones de 0,5 ml en tubos eppendorf de 1,5 ml conteniendo 50 µl de Tris-HCl 2M pH 8. Tras la elución, se lavó la columna con 1 ml de glicina y 2-3 volúmenes de PBS. Finalmente, se lavó con 1 volumen de PBS con azida al 0,02% (v/v) para conservar la columna a 4 °C.

Las fracciones de la cromatografía se analizaron en geles SDS-PAGE, y se juntaron aquellas que contenían fB purificado. La muestra se dializó frente a PBS (1X) NaCl 50 mM pH 7,3, utilizando un casete de diálisis de 3500 PM (*Slide-Analyzer®*, *Thermo Scientific*), y finalmente se concentró utilizando filtro de ultracentrifugación (*Amicon®*, *Millipore*), hasta una concentración final de aproximadamente 1 mg/ml.

3.7.2 Purificación de C3 humano

C3 fue purificado a partir de una mezcla de plasma humano. Se añadió al plasma EDTA 10 mM, y se centrifugó 30 min a 12000 rpm y 4 °C, tras lo cual se añadió 10 mM de benzamidina y se precipitó, poco a poco y con agitación, con sulfato de amonio al 10% a temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se centrifugó 1 h a 10000 rpm, y el sobrenadante se dializó durante 2 días, con 4 cambios de tampón de diálisis de

1L, frente a tampón fosfato 50 mM, benzamidina 5 mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM a pH 7. La muestra dializada se centrifugó 30 min a 12000 rpm y se filtró con una membrana de tamaño de poro de 20 µm. Tras esto, se cargó la muestra en una columna de intercambio aniónico (DEAE, *GE Healthcare*) como primer paso de purificación, y después en una columna de intercambio catiónico de S-lysina con volumen de cama 0,2 veces el volumen inicial de plasma, utilizando tampón fosfato 50 mM, benzamidina 5 mM, EDTA 10 mM, NaCl 300 mM pH 7. La proteína eluida se concentró con un filtro de ultracentrifugación (Amicon®, *Millipore*), tras lo cual se dializó durante 2 días frente a tampón Tris 20 mM pH 8,6. Por último, la muestra se centrifugó 30 min a 12000 rpm y se cargó en una columna de intercambio iónico DEAE previamente equilibrada con Tris 20 mM pH 8,6, y se eluyó con un gradiente lineal de 200 ml de 0 a 350 mM NaCl. Las fracciones recogidas de la cromatografía se analizaron mediante ELISA para determinar cuáles contenían C3, se agruparon y dializaron en tampón fosfato 20 mM, NaCl 40 mM pH 6. La muestra dializada se centrifugó 30 min a 12000 rpm y se filtró con una membrana de tamaño de poro de 10 µm. Después se cargó en una columna de intercambio catiónico (Mono S, *GE Healthcare*) equilibrada en tampón fosfato 20 mM, NaCl 40 mM pH 6, y la elución se realizó mediante un gradiente de concentración de NaCl desde 40 mM a 500 mM. Las fracciones de 1 ml recogidas se neutralizaron con 20 µl de tampón fosfato 1M pH 8, se alicuotearon y almacenaron a -80 °C para su posterior uso.

- **Generación de C3b**

C3b se generó mediante digestión con tripsina de C3 (2 min a 37 °C). La tripsina se inactivó mediante la adición del inhibidor SBTI. La correcta proteólisis de la proteína en sus fragmentos C3a y C3b fue analizada mediante SDS-PAGE. El fragmento C3b fue purificado mediante una cromatografía de intercambio aniónico (Mono Q, *GE Healthcare*), seguida de una cromatografía de exclusión molecular (*Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare*).

- **Generación de iC3b**

iC3b fue generado a partir de C3b, mediante la digestión de este con fH (o MCP) y fI durante 1h a 37 °C en tampón Tris 20 mM, NaCl 150 mM y Tween 0,02% (v/v). De nuevo se comprobó la digestión de C3b mediante SDS-PAGE.

- **Generación de C3dg**

Para obtener C3dg, se incubó C3b de manera similar al apartado anterior para la generación de iC3b, pero en condiciones de baja fuerza iónica. iC3b y C3dg se purifican mediante cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular.

3.7.3 Purificación de anticuerpos de diversos fragmentos de C3

La expresión y purificación de los anticuerpos fue llevada a cabo en el laboratorio del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba (CIB-CSIC), de la que una parte se cedió bajo la colaboración entre los dos grupos para la realización de los ensayos descritos en este trabajo.

3.8 Análisis bioquímico de proteínas

3.8.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Para la separación de las proteínas mediante electroforesis se emplearon geles de poliacrilamida, de un porcentaje adecuado, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), siguiendo el método descrito por Laemmli (Laemmli UK, 1970) según el cual las proteínas se separan en la matriz del gel en función de la masa molecular. Las muestras de proteína se prepararon mediante la adición de tampón de carga 5X (Tris-HCl 250 mM pH 6,8, DTT 500 mM, SDS 10%, azul de bromofenol 0,5% y glicerol 50%) y, para experimentos en condiciones reductoras, β -mercaptoetanol 2 mM, y su posterior calentamiento a 95 °C durante 5min. La electroforesis se llevó a cabo en sistemas Mini-Protean Cell (*Bio-Rad*), aplicando una corriente inicial de 100 V para el gel concentrador y 180 V para el gel separador. La visualización de las proteínas se

realizó mediante su tinción con azul de Coomassie, agente de tinción comercial *SimplyBlue SafeStain®* (Invitrogen), nitrato de plata, o mediante una tinción fluorescente Oriole Fluorescent Gel Stain® (Bio-Rad), según la sensibilidad requerida.

3.8.2 Inmunodetección mediante Western Blot

Los ensayos de inmunodetección se realizaron utilizando anticuerpos específicos que se detallan en la **Tabla 3.6**. Tras la separación de las proteínas mediante SDS-PAGE, estas fueron transferidas a membranas de PVDF (*Bio-Rad*) e incubadas con el anticuerpo adecuado. De manera general, las membranas se incubaron en solución de bloqueo (PBS 1x, Tween20 0,05% y BSA 3% (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente para su posterior incubación con el anticuerpo primario a una dilución apropiada en tampón PBS 1X, BSA 0,1% (p/v), Tween20 0,05% durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente el exceso de anticuerpo se eliminó mediante 3 lavados de 10 min con tampón de lavado (PBS 1x, Tween20 0,05%), y se incubó con el anticuerpo secundario (anti-IgGs de ratón o de conejo) conjugado con HRP. De nuevo se realizaron 3 lavados de 10 min y finalmente se reveló la quimioluminiscencia de la peroxidasa utilizando el agente comercial *ECL Plus®* (*GE-Healthcare*). Las señal fue recogida en películas fotográficas (*Kodak*) mediante autorradiografía o visualizada digitalmente en un equipo *Fujifilm Fluorescent Image Analyzer FLA-3000*.

Anticuerpos Primarios			
Proteína	Tipo	Condiciones de Incubación	Origen
C3	Policlonal de ratón	Dilución 1/1000 Tiempo 1h	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
C3	Humano	Dilución 1/1000 Tiempo 1h	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
fB	Humano	Dilución 1/1000	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
fB	NSC	Tiempo 12h	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
fB	monoclonal humano	Dilución 1/1000	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
fB	JC1	Tiempo 1h	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
fB	monoclonal humano	Dilución 1/2000	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba
fB	D2	Tiempo 1h	Laboratorio Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba

Anticuerpos Secundarios			
Tipo	Reactividad	Condiciones de Incubación	Origen
Anti-IgG	IgG de conejo	Dilución 1/5000 Tiempo	<i>GE-Healthcare</i>
	Conjugado con HRP	30min	
Anti-IgG	IgG de ratón	Dilución 1/5000 Tiempo	<i>GE-Healthcare</i>
	Conjugado con HRP	30min	
Anti-IgG	IgG de cabra	Dilución 1/5000 Tiempo	<i>GE-Healthcare</i>
	Conjugado con HRP	30min	

Tabla 3.6 Anticuerpos primarios y secundarios empleados en la detección de proteínas mediante ensayos de Western Blot y ELISA.

3.9 Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se utilizó rutinariamente en la purificación y caracterización de proteínas y complejos multiproteicos. Las columnas y condiciones que se emplearon se detallan en la **Tabla 3.7**. Los equipos de cromatografía que se emplearon fueron un *AKTA ETTAN* (*GE Healthcare*) y un *AKTA purifier* (*GE Healthcare*). Todas las condiciones de trabajo se optimizaron previamente en cuanto a flujo, volumen de muestra inyectada y tampón, para emplear la más óptima para cada muestra, trabajando siempre dentro de los parámetros sugeridos por el fabricante.

Proteína	Columna	Condiciones
fB	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
C3	Superose6 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	
C3b	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
iC3b	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
Fab C3-12.17	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
Fab C3-16.4	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
Fab C3-12.2	Superdex 200 PC 3,2/30 2,4ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM

Tabla 3.7 Cromatografía de exclusión molecular. Condiciones experimentales para las diferentes proteínas de estudio.

3.10 Cromatografía de afinidad

Se emplearon columnas de inmunoafinidad para la purificación de C3, fB y fragmentos Fab que aparecen reflejadas en la **Tabla 3.8**. Para fB se utilizó una columna de sefarosa con un anticuerpo monoclonal anti-factor B humano, unido de manera covalente (clon D2).

Proteína	Columna	Condiciones
fB	DEAE Affi-Gel® Blue Gel 5ml	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
C3	S-Lysina	Tris-HCl 20 mM pH 8,6, NaCl 50 mM
	DEAE-Sephacel®	
Fab C3-12.17	Columna Proteína A	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
Fab C3-16.4	Ficina Inmovilizada	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
	Columna Proteína A	
Fab C3-12.2	Ficina Inmovilizada	Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM
	Columna Proteína A	

Tabla 3.8 Cromatografía de afinidad. Condiciones experimentales empleadas para las diferentes proteínas de estudio.

3.11 Cromatografía de intercambio iónico

La **Tabla 3.9** detalla las columnas y condiciones de tampón empleados en las cromatografías de intercambio iónico para la purificación de C3, fB y fragmentos Fab de los distintos anticuerpos.

Proteína	Columna	Condiciones
C3	DEAE	Tris-HCl 20 mM pH 8,6, NaCl 75 mM
	Mono-S	Fosfato 20 mM, NaCl 40 mM
C3b	Mono-Q	Hepes 10 mM, NaCl 150 mM
iC3b	DEAE	Hepes 10 mM, NaCl 150 mM
Fab C3-12.17	<i>Desalt Spin Column</i>	Tris 20 mM, NaCl 60 mM
Fab C3-16.4	<i>Desalt Spin Column</i>	Tris 20 mM, NaCl 60 mM
Fab C3-12.2	<i>Desalt Spin Column</i>	Tris 20 mM, NaCl 60 mM

Tabla 3.9 Cromatografía de intercambio iónico. Condiciones experimentales para las diferentes proteínas de estudio en los experimentos de cromatografía de intercambio iónico.

3.12 Generación y purificación de fragmentos Fab

Los fragmentos Fab de cada anticuerpo se generaron utilizando un kit específico de preparación *Pierce® Mouse IgG₁ Fab and F(ab')₂* (*Thermo Scientific*) aplicando y optimizando las instrucciones detalladas por el fabricante. Los Fabs se purificaron mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (*GE Healthcare*) utilizando tampón Tris 20 mM, NaCl 60mM y 1% inhibidor de proteasas libre de EDTA (*Roche*). Las fracciones correspondientes al máximo de absorbancia fueron analizadas mediante SDS-PAGE para verificar la presencia de Fab y posteriormente concentradas con sistemas Amicon® Ultra-4 (*Millipore*).

3.13 Análisis de los inmunocomplejos mediante cromatografía de exclusión molecular

- **Formación de complejos anticuerpo-iC3b**

Los inmunocomplejos se prepararon incubando el anticuerpo monoclonal (C3-12.2, C3-16.4 ó C3_12.17) con iC3b a 37 °C durante 30 min a una relación molar 1:1,5 para C3-12.17, añadiendo 10 µg de iC3b y 16 µg de Fab C3-12.17. Se ensayó una relación molar 1:1 para C3-12.2, añadiendo 11 µg de iC3b y 11 µg de Fab C3-12.2 y una relación molar 1:1 para C3-16.4, añadiendo 8 µg de iC3b y 9 µg de Fab C3-16.4.

Antes de inyectar el complejo en la columna, la mezcla se incubó durante 20 min a 37 °C y se reservó 1 µg del complejo para su análisis mediante gel SDS-PAGE. La separación del inmunocomplejo se realizó utilizando una columna Superdex 200 PC 3.2/30 (*GE Healthcare*) equilibrada en Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 75 mM.

3.14 Ensayos en fase fluida

Se incubaron 20 µg de C3b/iC3b a 37 °C con fH (10 µg), sMCP (6 µg) ó CR1 (6 µg) y fI (1,2 µg) en 20 mM Tris y 40 mM NaCl ó 20 mM Tris-HCl y 0 mM NaCl. Se tomaron alícuotas mezcla de reacción (2 µg) de iC3b pasados 0, 1, 2, 5, 10, 60, 120 y 180 min. La reacción se detuvo añadiendo SDS. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE 10% bajo condiciones reductoras.

- **Ensayo de inhibición del corte de C3**

Para analizar la capacidad de los anticuerpos monoclonales (mAbs) de inhibir el corte proteolítico de C3 se diseñó un ensayo *in vitro* en el que se incubó C3 (1 µg) con 2 µg y 4 µg de cada mAb durante 10 min en baño de agua a 37 °C, en 25 µl de tampón AP (2,9 mM barbital, 1,7 mM barbital sódico, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 7,4), tras lo cual se añadió fB (1 µg) y 10 min después fD (5 ng). La mezcla se incubó durante otros 40 min. La proteólisis de C3 se evaluó mediante SDS-PAGE 10% en condiciones reductoras y tinción con azul de Coomassie.

3.15 Ensayos de SPR

Los ensayos de SPR (*Surface Plasmon Resonance*) se realizaron en un equipo Biacore T100 (*GE Healthcare*) en colaboración con el grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba. C3b fue inmovilizado covalentemente sobre un chip CM5 (dextrano carboximetilado) a través de los grupos amino utilizando un kit de acoplamiento NHS/EDC y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los ensayos cinéticos de fH y sMCP y formación de convertasa se inmovilizaron 501 unidades relativas (RU) de iC3b y 510 RU de C3b. Para analizar la unión de CR1, se inmovilizaron 92RU de C3b o 88RU de iC3b. Los experimentos se realizaron a 25 °C y un flujo de 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, y fueron referenciados doblemente (se sustrajeron los datos de una celda de referencia y una inyección de tampón) para controlar el incremento en el índice de refracción.

Los analitos se fluyeron a través de la superficie de C3b a diferentes concentraciones. La formación de convertasa se analizó en tampón 10 mM Hepes (pH 7,4), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , y 0,01% (v/v) SP20, y la cinética del regulador fD se analizó mediante su flujo a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 10 mM Hepes (pH 7,4), 150 mM NaCl, y 0,01% (v/v) SP20. La superficie se regeneró en todos los casos con 10 mM acetato de sodio (pH 4) y 1 M NaCl. Los datos se evaluaron usando el programa Biaevaluation T100 (*GE Healthcare*) y las cinéticas de fH, sMCP, y sCR1 se estudiaron mediante análisis del estado estacionario. El ajuste global se utilizó para determinar los parámetros cinéticos que todas las curvas, a diferentes concentraciones, ajustaban dentro del experimento.

3.16 Ensayos de SAXS

Los experimentos de SAXS fueron realizados completamente por el grupo de Cristina Vega en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC) y recogidos en una estación BioSAXS (ID14EH3) en el Sincrotrón Europeo. La longitud de onda se fijó a $\lambda = 0,931 \text{ \AA}$ (13,32 keV), y la distancia de la muestra al detector se ajustó a 2,43 m, resultando en un vector de dispersión q , en el rango de 0,009 a $0,6 \text{ \AA}^{-1}$.

Todos los experimentos se realizaron a 5 °C. Se cargaron 35 µl de las muestras de proteína purificada homogéneamente (C3, C3b e iC3b) en un capilar de cuarzo de 1,8 mm montado al vacío, y los datos de dispersión recogidos fueron medidos usando un robot automatizado que asegura un flujo constante de muestra a través de la corriente durante la exposición a Rayos X para minimizar el daño de radiación. De este modo se recogieron las imágenes de dispersión en 2D. Se tomaron mediciones en un rango de concentraciones de C3 (1–5 mg/ml), C3b (1–3 mg/ml), e iC3b (1–5 mg/ml).

3.17 Microscopía Electrónica de Transmisión

3.17.1 Preparación de las muestras

Para visualizar las muestras en el microscopio electrónico mediante tinción negativa, se aplicaron 5-10 µl de muestra (barriendo un rango de diluciones entre 0,01 y 0,1 mg/ml en el tampón correspondiente) sobre rejillas de cobre de 400 agujeros cubiertas de una fina capa de carbón, las cuales, se expusieron previamente a descarga iónica durante 1 min para generar una superficie hidrofílica que facilite la adsorción de la muestra. Las rejillas se incubaron durante 1-2 min con la muestra, tras lo cual se lavaron con agua mili-Q, y finalmente se incubaron con el agente de tinción (2% (p/v) acetato de Uranilo o 2% (p/v) formiato de Uranilo) durante 1 min. Tras la tinción, las rejillas se dejaron secar a temperatura ambiente. En cada paso, el exceso de líquido se eliminaba con papel de filtro Whatman (*Whatman, GE-Healthcare*).

3.17.2 Adquisición de datos

Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL-1230 (CIB-CSIC) equipado con un filamento de Wolframio, estabilizado a 100kV, o JEOL 1210 estabilizado a 80kV (CBM-CSIC). Se seleccionó una zona óptima sobre la que se tomaron las micrografías electrónicas en condiciones de mínima dosis electrónica (12 e-/Å²) de manera semiautomática utilizando el programa TVIPS F416 CMOS a una magnificación real de 68.222X y 2,28 Å/pixel.

3.17.3 Procesamiento digital de imágenes

La función de transferencia de contraste o CTF (*Contrast Transfer Function*) fue estimada para cada una de las micrografías mediante el programa CTFFIND3 (Mindell y Grigorieff, 2003) y corregida utilizando el programa BSOFT (Heymann, *et al.*, 2007). Se realizó una comprobación visual y se descartaron aquellas imágenes astigmáticas y/o que presentaban deriva. A continuación se seleccionaron de manera semiautomática las imágenes correspondientes a partículas individuales utilizando un tamaño de caja apropiado y aplicando una normalización de la escala de grises a media 1, y desviación estándar 0. Las imágenes se extrajeron utilizando un conjunto de programas incluidos en la plataforma EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999), se promediaron y submuestrearon en un factor 2, hasta una resolución final de 4.56 Å/pixel, y se normalizaron y filtraron con distintos algoritmos disponibles en los paquetes informáticos EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999) y XMIPP (Marabini, *et al.*, 1996; Sorzano, *et al.*, 2004; Scheres, *et al.*, 2008).

3.17.4 Alineamiento y clasificación 2D de partículas individuales

La baja relación señal-ruido en las imágenes de partículas individuales que se obtienen en microscopia electrónica, hace necesario la clasificación de los datos en medias 2D que son proyecciones más o menos abundantes contenidas en la determinación de una estructura. Mediante diferentes métodos que combinan iterativamente el alineamiento y la clasificación de imágenes en 2D se obtiene una imagen media de cada clase. Estos métodos utilizan múltiples referencias para desarrollar un refinamiento, y son especialmente hábiles a la hora de clasificar diferentes imágenes con un nivel muy alto de similitud.

En este trabajo, se realizó un análisis inicial de los datos en dos dimensiones mediante los programas *refine2d.py* de EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999) y ML2D (*Maximum Likelihood alignment 2D*) (Scheres, *et al.*, 2005) y CL2D (*Clustering 2D*) (Sorzano, *et al.*, 2010) de XMIPP, algoritmos que llevan a cabo clasificaciones y alineamientos de las imágenes libres de patrón. En EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999) y EMAN2 (Tang, *et al.*, 2007) la clasificación está basada en correlación cruzada, mientras que para XMIPP (Sorzano CO, *et al.*, 2004) el programa ML2D utiliza un

algoritmo de máxima verosimilitud en el cual se calcula la imagen promedio de aquellas imágenes que corresponden a una misma dirección de proyección, teniendo como referencia la mejor relación señal/ruido respecto a las imágenes individuales. Estas medias 2D obtenidas pasan a ser una representación de las partículas más representativas de todo el conjunto (Scheres SH, *et al.*, 2005.b).

Las medias 2D de referencia que se seleccionaron como las más representativas se analizaron en más profundidad con el programa KernenSOM (*Kernel probability density estimator self-organizing map*), implementado en XMIPP (Pascual-Montano, *et al.*, 2001), el cual está basado en un algoritmo de mapas auto-organizativos que clasifica en función de sus espectros rotacionales (Kangas, *et al.*, 1990) (Kohonen, 1990) para la búsqueda de heterogeneidad en conjuntos de datos *a priori* homogéneos. Los datos se ordenan en una matriz vectorial 2, en la cual los vectores más próximos son más parecidos a los que se disponen más alejados. Esta clasificación fue especialmente útil en la obtención de medias 2D de la estructura de iC3b/Fab (C3-12.2).

3.18 Reconstrucción tridimensional

3.18.1 Generación de volúmenes iniciales

El primer paso para obtener una estructura en 3D es generar unos volúmenes iniciales, y refinarla, paso a paso, con los datos obtenidos (set de partículas). Para ello se siguen diferentes estrategias:

Líneas comunes. Se pueden seleccionar las medias libres de referencia obtenidas en la clasificación 2D con el comando *refine2d* de EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999) y generar un volumen inicial de líneas comunes. Estos volúmenes se pueden construir con el comando *startcsym* de EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999) o *initial model* de EMAN2 (Tang, *et al.*, 2007).

Elipsoides. Se pueden emplear como volúmenes de referencia elipsoides con una distribución de masa Gaussiana.

RCT. (*Random Conical Tilt*). Inclínación cónica aleatoria. Se pueden generar volúmenes de referencia tomando pares de imágenes a 0 y 45° de inclinación.

PDB. Podemos obtener un volumen de referencia filtrando a media-baja resolución (100-200 Å) una estructura que se haya resuelto previamente mediante cristalografía de Rayos X, RMN o ME-3D, que tenga cierta relación estructural, o incluso ella misma, si lo que estamos describiendo es la misma molécula en un complejo.

3.18.2 Refinamiento angular

El refinamiento de un volumen se realiza mediante un proceso de refinamiento angular iterativo. Para ello, se utilizó el comando *refine* de EMAN (Ludtke, *et al.*, 2001), sobre todo en los pasos iniciales, y se complementó con pasos de refinamiento utilizando el programa ML3D implementado en XMIPP (Scheres, *et al.*, 2001). El programa ML3D está basado en máxima verosimilitud, y permite separar en clases las diferentes proyecciones de una molécula a partir de un mapa filtrado que se utiliza como referencia.

Para realizar el refinamiento angular se partió de los volúmenes iniciales generados, y se supervisaron los sucesivos pasos de refinamiento. El refinamiento a partir de distintos volúmenes iniciales debe converger en la misma estructura. Este se da por finalizado cuando el modelo deja de evolucionar, y además, presenta una alta correlación con las partículas individuales y las medias libres de referencia que se utilizaron en ese experimento.

3.18.3 Estimación de la resolución

La resolución de las estructuras se realizó utilizando el comando *eotest* de EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999). Este programa toma el conjunto de partículas de la última iteración del refinamiento angular y lo divide aleatoriamente en dos grupos. Con cada uno de los grupos se reconstruye un volumen. Estos dos volúmenes se correlacionan entre sí, en función de la frecuencia espacial en el espacio de Fourier (FSC, *Fourier Shell Correlation*) para obtener una estimación de la resolución. Esta resolución se estimó fijando el valor FSC en 0,5.

3.19 Visualización y ajuste de estructuras atómicas

Utilizamos las estructuras resueltas previamente mediante cristalografía de Rayos X o Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para ajustarlas a los mapas de densidad electrónica obtenidos. Las estructuras atómicas del anillo MG de C3 (código PDB ID 2A73) (Janssen, *et al.*, 2005) y de C3b (código PDB ID 2I07) (Janssen, *et al.*, 2006) (**Tabla 3.10**) fueron ajustadas a la densidad de ME utilizando SITUS (Wriggers, *et al.*, 2001), mostrando unos coeficientes de correlación de $>0,8$. Los dominios CUB, TED y C345C se ajustaron manualmente a la densidad de ME, y el ajuste refinado, utilizando el programa COLOCOR de SITUS (Wriggers, *et al.*, 2001) y UCSF Chimera (Goddard, *et al.*, 2007). La localización exacta de los dominios CUB y TED en el ME fue representada después de colorear la correspondiente densidad del mapa de ME. Todos los mapas de ME y estructuras fueron visualizadas utilizando UCSF Chimera (Pettersen, *et al.*, 2004).

Dominio Estructural	Código PDB
Anillo MG de C3	2A73
Anillo MG de C3b	2I07
IgG	1IGT

Tabla 3.10 Estructuras atómicas encajadas en los mapas de ME-3D y sus correspondientes códigos PDB.



4 Resultados

4.1 Estructura de iC3b resuelta mediante microscopía electrónica a 24 Å

En este trabajo se ha determinado la estructura 3D de iC3b a media resolución empleando ME-3D, corroborando estos resultados también mediante SAXS (dispersión de rayos X de bajo ángulo). Los datos de este estudio revelan que iC3b presenta una conformación definida, distinta de las encontradas en C3 y C3b. Estos resultados contrastan con la observación de un TED móvil alrededor del anillo MG.

4.1.1 La ME muestra que iC3b presenta una conformación definida

Para resolver la estructura de iC3b se utilizaron dos preparaciones de iC3b purificado de origen humano, una comercial de la empresa *Calbiochem*, a la que se aplicó un paso adicional de purificación utilizando una columna de cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 PC 3.2/30 (*GE Healthcare*), y otra preparación de iC3b producida en nuestro laboratorio a partir de C3 humano. En este segundo ensayo, la preparación de C3 fue incubada con MCP recombinante soluble y fI, y posteriormente purificada combinando una cromatografía de intercambio aniónico y de exclusión molecular (**Fig. 4.1.1** y **Fig. 4.1.2**). Las fracciones recogidas en la cromatografía de exclusión molecular que contenían la proteína purificada iC3b de cada preparación fueron utilizadas en posteriores ensayos de microscopía electrónica. Los perfiles cromatográficos y el análisis mediante SDS/PAGE de ambas preparaciones de iC3b fueron indistinguibles (**Fig. 4.1.2**).

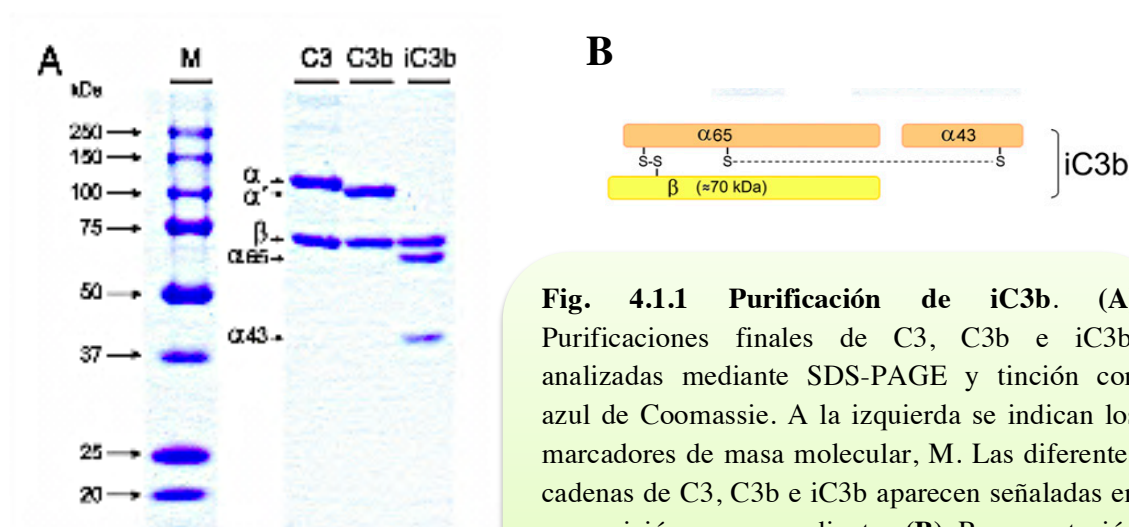


Fig. 4.1.1 Purificación de iC3b. (A) Purificaciones finales de C3, C3b e iC3b, analizadas mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie. A la izquierda se indican los marcadores de masa molecular, M. Las diferentes cadenas de C3, C3b e iC3b aparecen señaladas en su posición correspondiente. (B) Representación esquemática de la estructura primaria de iC3b. Se indican las cadenas α (naranja) y β (amarillo).

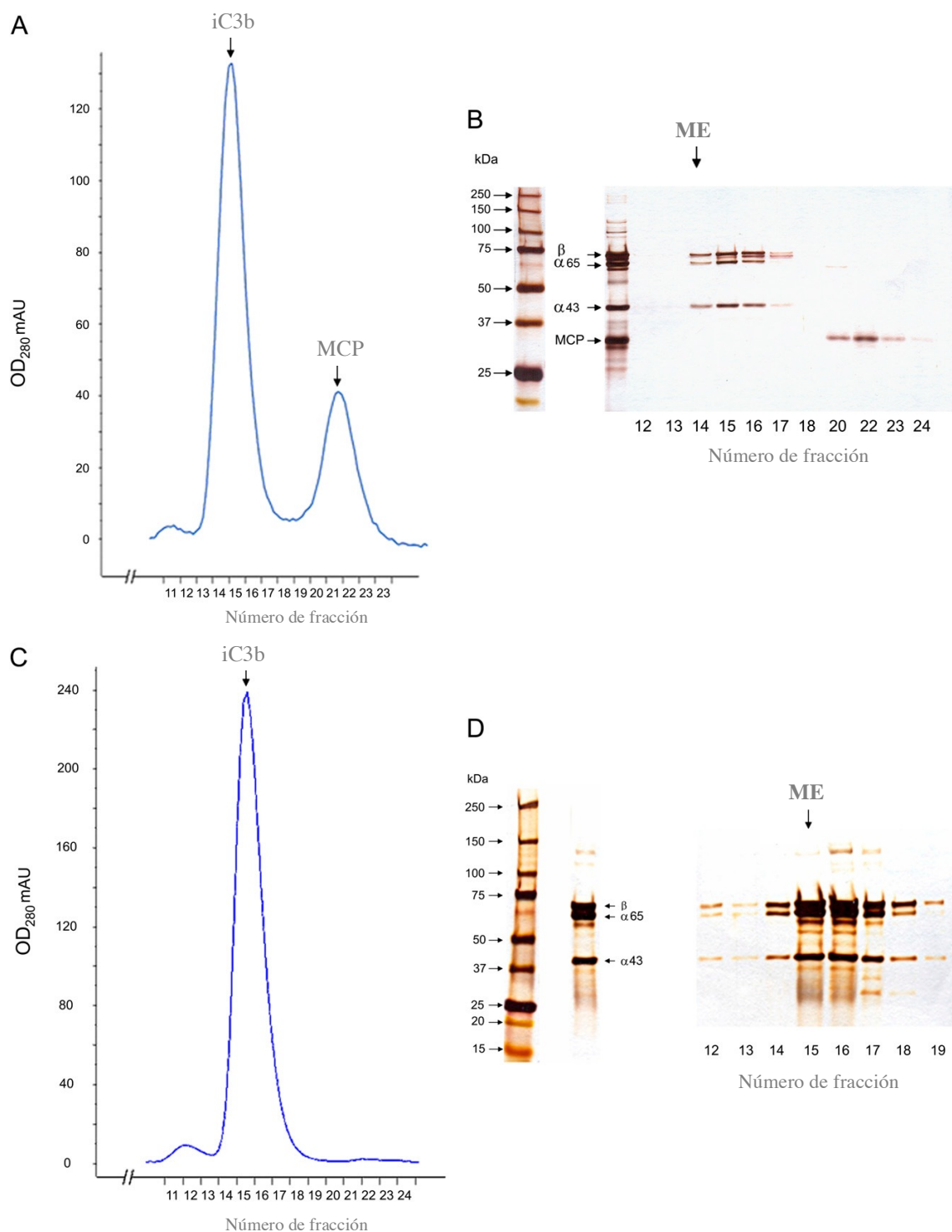


Fig. 4.1.2 Purificación de iC3b. (A) Perfil de elución de la cromatografía de gel-filtración de iC3b generado por la incubación de C3b con sMCP y cantidades subestequiométricas de fl. sMCP se separa del pico principal que corresponde a iC3b. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata de las fracciones recogidas de la cromatografía en (A). La fracción seleccionada para ME aparece marcada. (C) Perfil de elución de la cromatografía de gel-filtración de iC3b de Calbiochem. (D) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata de las fracciones recogidas de la cromatografía en (C). La fracción seleccionada para microscopía aparece marcada como ME.

La muestra de iC3b recién purificada fue visualizada en el microscopio electrónico y se tomaron micrografías electrónicas para su procesamiento digital. 29730 imágenes de moléculas individuales fueron seleccionadas para la reconstrucción 3D de la estructura de la molécula (**Fig. 4.1.3**).

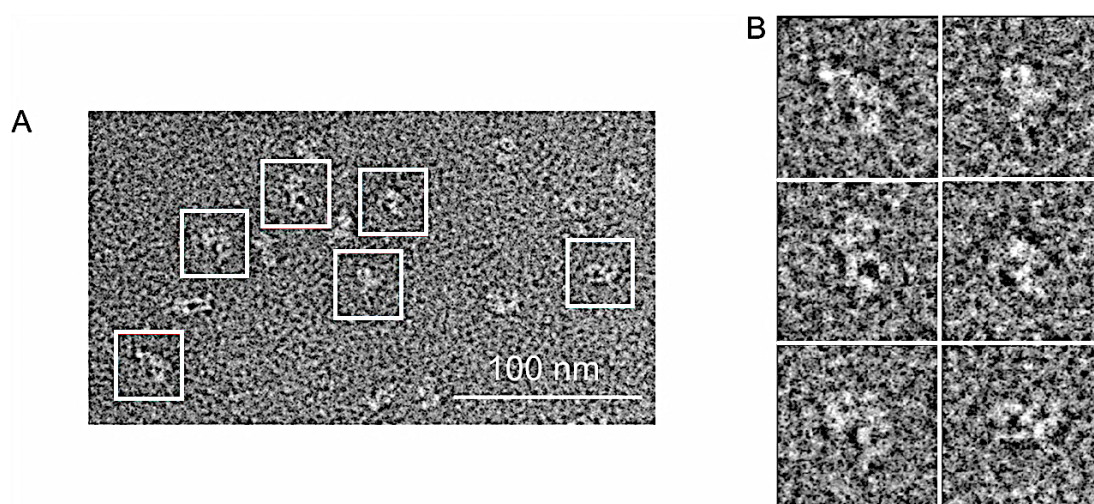


Fig. 4.1.3 Microscopía electrónica de la molécula de iC3b. (A) Campo típico de iC3b observado al ME, donde se destacan algunas moléculas seleccionadas en una caja. Barra de escala, 100nm. (B) Galería de partículas individuales seleccionadas. Se muestran algunas vistas características de la molécula.

Estas imágenes fueron sometidas a una clasificación libre de referencia para agrupar aquellas imágenes con vistas de la proteína equivalentes, las cuales fueron alineadas y promediadas. (**Fig. 4.1.4, A**).

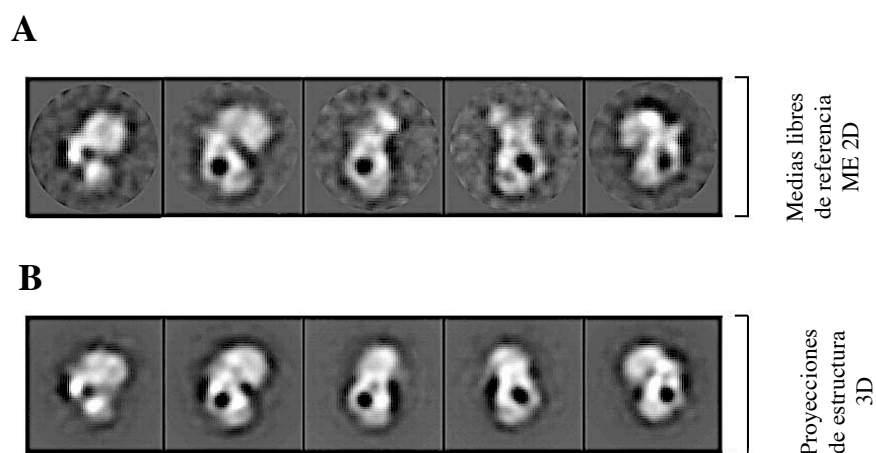


Fig. 4.1.4 ME de iC3b. (A) Medias 2D libres de referencia de moléculas individuales de iC3b. (B) Proyecciones de la estructura de iC3b obtenidas por métodos de refinamiento angular ajustándose a las medias libre de referencia tal y como se muestra en A.

Seguimos el mismo procedimiento para la muestra purificada a partir del corte con MCP y fl, obteniendo también en este caso medias 2D libres de referencia (**Fig. 4.1.5**).

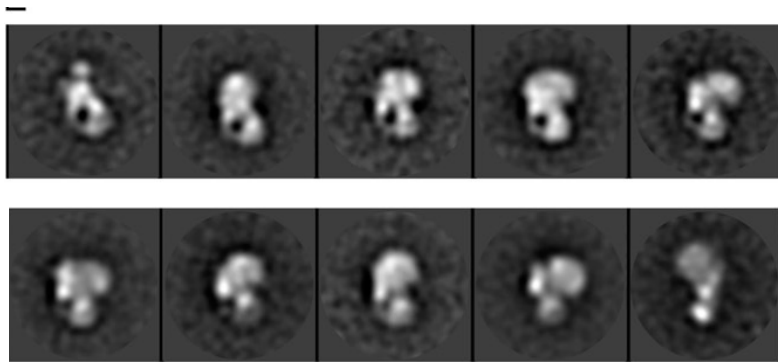


Fig. 4.1.5 Medias 2D de iC3b. Medias 2D libres de referencia de imágenes de molécula-individual de iC3b purificada en nuestro laboratorio. Estas medias fueron idénticas a las obtenidas para la preparación comercial de Calbiochem (**Fig. 4.1**).

La molécula de iC3b se adhiere al soporte de microscopía electrónica en diferentes orientaciones; una vista típica exhibe el anillo macroglobulina (MG) (**Fig. 4.1.6**, azul), con un agujero en la parte inferior del anillo y una densidad ancha en la parte superior (**Fig. 4.1.6**, gris). La comparación entre estas imágenes y las de C3 y C3b observadas en el microscopio electrónico mostraron que el dominio TED en iC3b se encuentra localizado en una posición adyacente a la ocupada por el TED en C3 (**Fig. 4.1.6**, B).

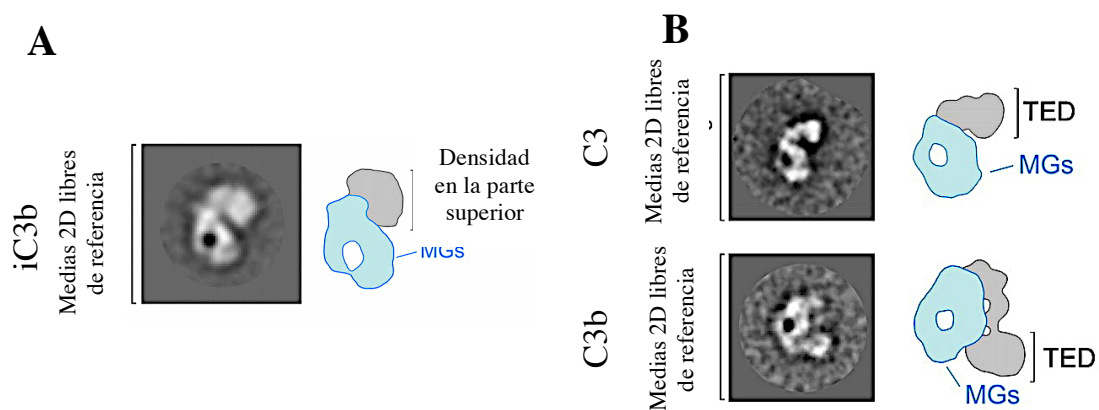


Fig. 4.1.6 Media 2D libre de referencia seleccionada de una vista típica de iC3b, C3 y C3b. El dibujo esquemático señala la localización del anillo MG (azul) y una amplia densidad en la parte superior (gris). **(B)** Medias 2D libres de referencia con vistas típicas de C3 (panel superior) y C3b (panel inferior). A la derecha se indican esquemas de las moléculas donde se señalan el dominio MG (azul) y TED (gris).

En estos experimentos observamos que las medias 2D de iC3b sugieren una localización precisa del dominio TED en todas las moléculas seleccionadas. Estos resultados contrastan con la heterogeneidad previamente descrita para la localización del dominio TED en imágenes de iC3b obtenidas mediante microscopía electrónica (Nishida N, *et al.*, 2006). Los experimentos realizados tanto en la muestra comercial, como en la preparación en el laboratorio de iC3b, mostraron resultados idénticos (**Fig. 4.1.7**).

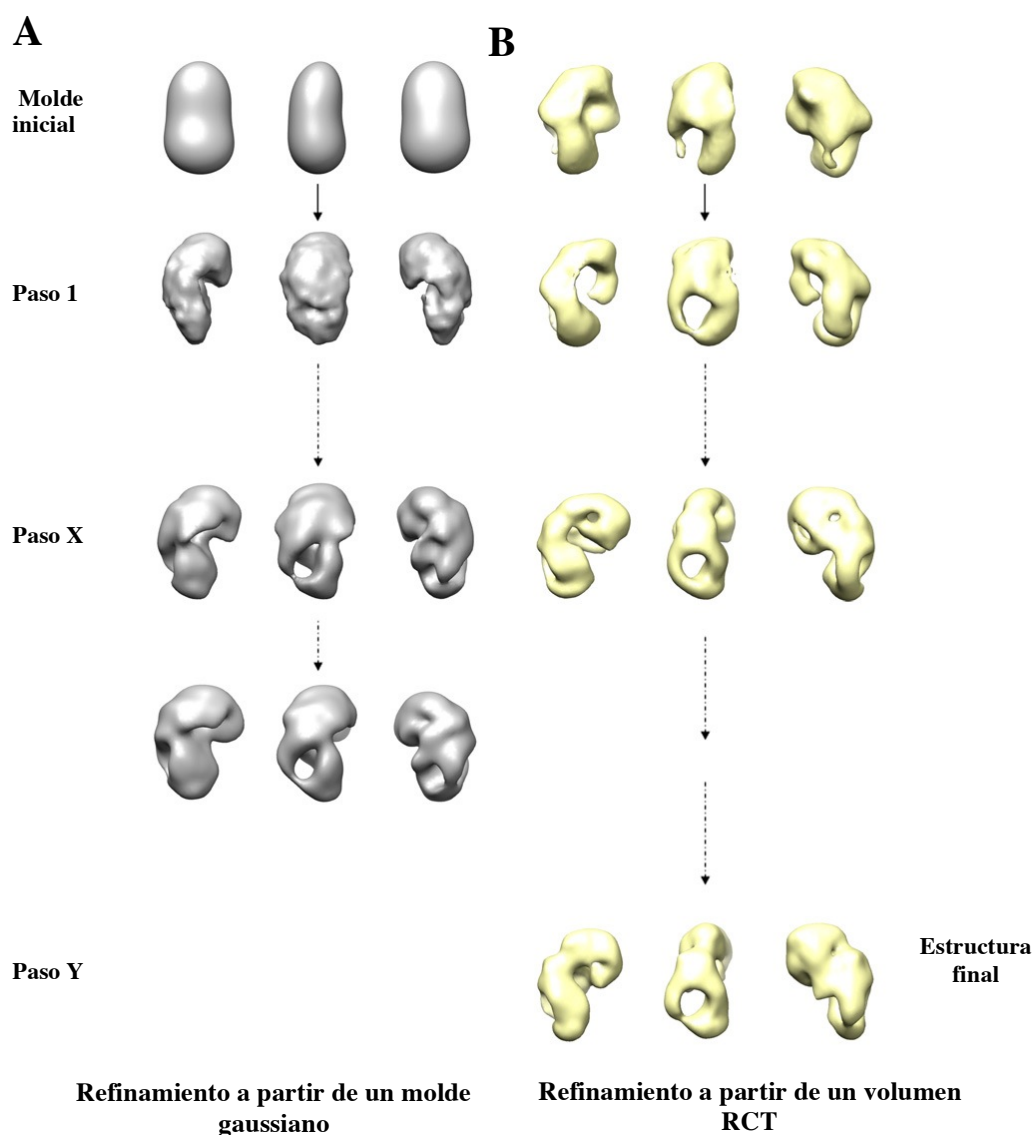


Fig. 4.1.7 Reconstrucción 3D de iC3b utilizando un molde gaussiano como plantilla inicial. (A) El conjunto de datos de imágenes de iC3b se refinó utilizando un molde gaussiano como referencia inicial. (B) A pesar de carecer de un modelo inicial, tras unos pasos de refinamiento, la reconstrucción adquirió características estructurales muy similares a los observados cuando el conjunto de datos se refinó a partir de la estructura RCT. Adaptado de (Alcorlo M, *et al.*, 2011).

4.1.2 Estructura 3D de iC3b

- Cambio de los dominios TED y CUB en C3, C3b e iC3b

Para corroborar la interpretación de las medias 2D, se procedió a reconstruir la estructura 3D de iC3b. Para ello, se refinaron los datos obtenidos utilizando como modelo inicial un volumen obtenido mediante la técnica de *random conical tilt* (RCT) como modelo inicial (**Fig. 4.1.3**). Para la reconstrucción se tomaron micrografías a 0 y 47 grados de inclinación, coleccionando varios cientos de pares de partículas extraídas manualmente (**Fig. 4.1.3 y Fig. 4.1.8**).

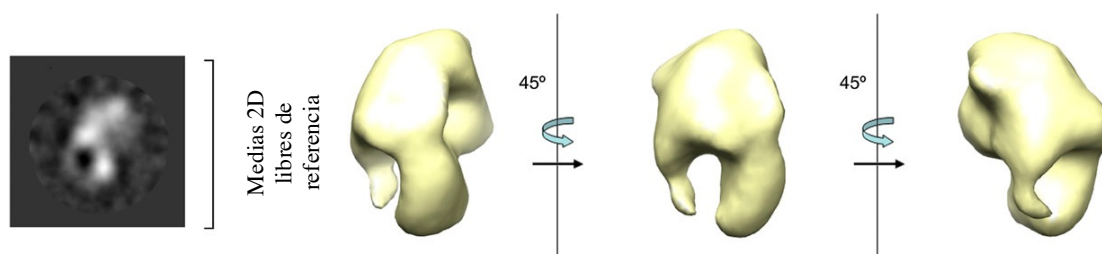


Fig. 4.1.8 ME de iC3b. Reconstrucción RCT de iC3b. (Izquierda) Media 2D libre de referencia de iC3b a 0° de inclinación obtenido a partir de clasificación con métodos de *maximum-likelihood* utilizando XMIPP (Sorzano CO, *et al.*, 2004). Varias vistas de la estructura RCT (Derecha) obtenidas a partir de pares de imágenes correspondientes a la media mostrada a la izquierda. Adaptado de (Alcorlo M, *et al.*, 2011).

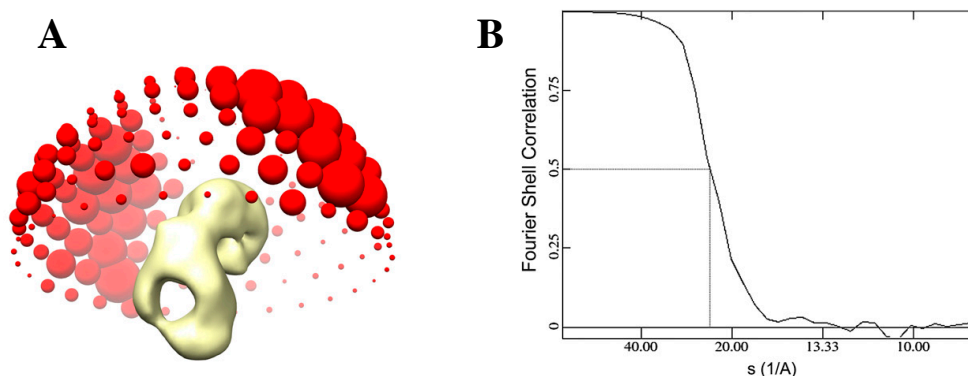


Fig. 4.1.9 Cobertura angular de las imágenes en el set de datos de iC3b y resolución. (A) El ángulo de Euler de cada imagen está representado como una esfera roja, cuyo diámetro es proporcional al número de imágenes asignadas a cada orientación después de refinamiento angular. Las imágenes en el set de datos corresponden a un amplio rango de orientaciones a lo largo del eje longitudinal de la proteína. (B) La resolución de la estructura fue estimada a 24 Å empleando un coeficiente de correlación cruzada de 0,5. Adaptado de (Alcorlo M, *et al.*, 2011).

Las medias obtenidas después del refinamiento angular fueron idénticas a las medias libres de referencia (**Fig. 4.1.4.A y 4.1.4.B**), corroborando la validez de la estructura refinada. Dado que se ha descrito por otros autores que el dominio TED presenta movilidad en torno al anillo MG, decidimos explicar si en nuestros datos podía coexistir otras conformaciones de iC3b compatibles con una mayor flexibilidad. Mediante métodos de *maximum-likelihood* se evaluó la potencial heterogeneidad conformacional de iC3b, lo cual revela, que todas las imágenes de iC3b recogidas correspondían a un conjunto muy parecido de conformaciones (**Fig. 4.1.10**).

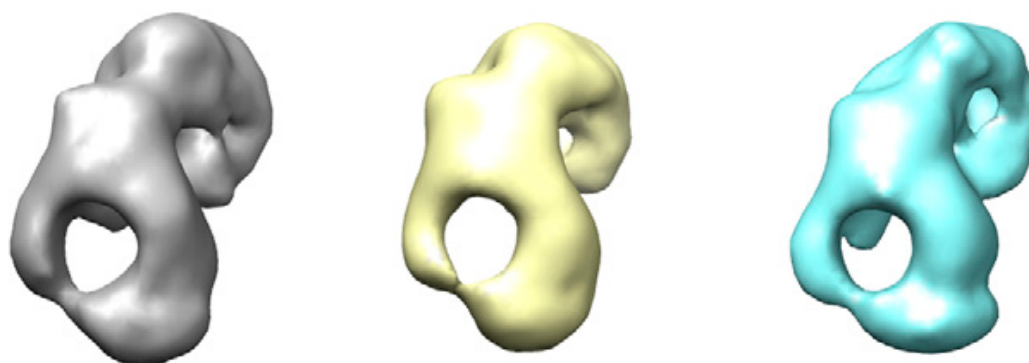


Fig. 4.1.10 Análisis de la heterogeneidad de iC3b. El set de datos fue clasificado en tres subconjuntos homogéneos utilizando clasificación 3D *maximum-likelihood* (Scheres SH, *et al.*, 2007). Se muestra una vista similar de cada una de las tres estructuras obtenidas después de clasificación, coloreadas de manera diferente cada una.

La estructura de iC3b a una resolución de 24 Å fue analizada mediante ajuste computacional de las estructuras disponibles de C3 y de C3b con el mapa de densidad de ME (**Fig. 4.1.9, B y Fig. 4.1.11**). El anillo MG fue el detalle estructural más obvio, que a esta resolución era compatible con la estructura atómica descrita para C3b (**Fig. 4.1.11, azul**).

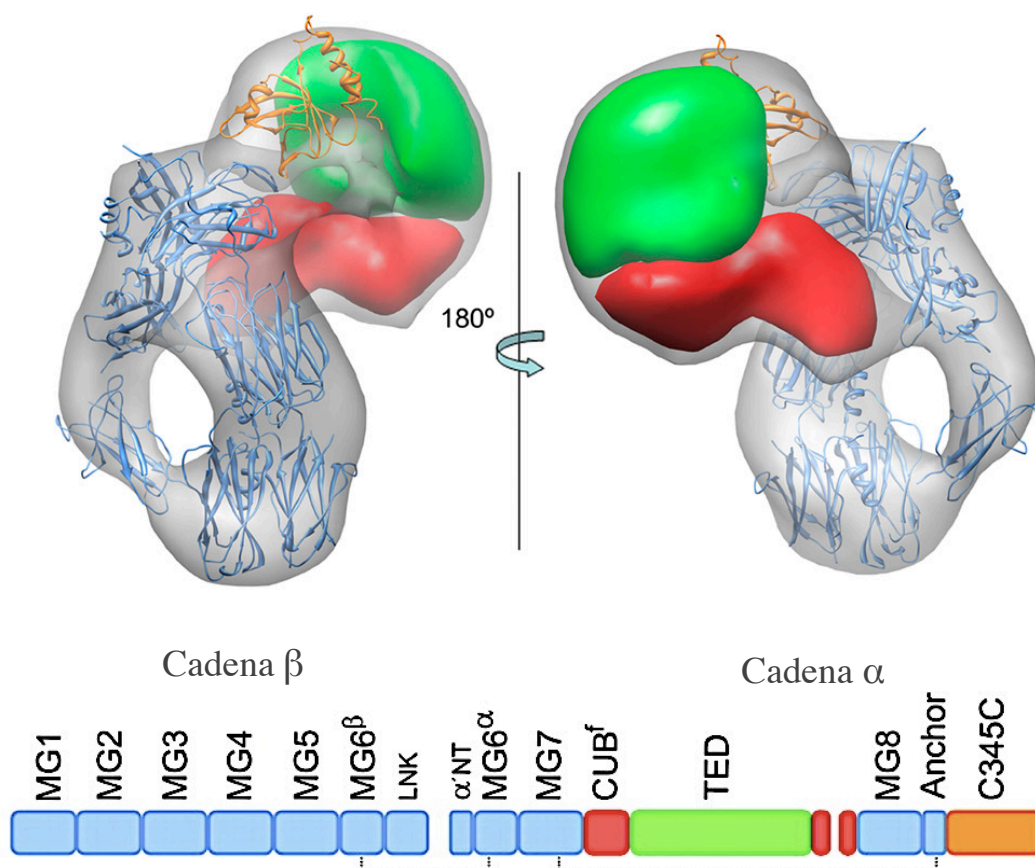


Fig. 4.1.11 Estructura de iC3b obtenida mediante ME-3D. Estructura 3D de iC3b mostrada como una densidad gris transparente. La estructura atómica del anillo MG (azul) y el dominio C345c (naranja) se seleccionó de la estructura de C3b (código PDB ID 2I07) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) y se ajustó en la estructura de ME. Las localizaciones precisas del dominio TED y una parte del dominio CUB en el mapa han sido coloreadas en verde y rojo respectivamente. Se muestra también la secuencia primaria de las cadenas de iC3b.

Durante el ajuste del anillo MG de C3 en la estructura de iC3b, este no encajaba de manera precisa al nivel de MG7 y MG8 (**Fig. 4.1.12**). Este resultado puso de manifiesto que los dominios MG7 y MG8 rotaban tras el corte de C3, exponiendo otras regiones que podrían interaccionar con ciertos inhibidores como CRIg (Sorzano CO, *et al.*, 2004). De este modo, el anillo MG es distinto en C3 y C3b. En nuestros ensayos, la conformación del anillo en iC3b aparece más similar a la de C3b. Por lo tanto, el anillo MG en iC3b es estructuralmente más parecido a C3b, que el que presenta C3.

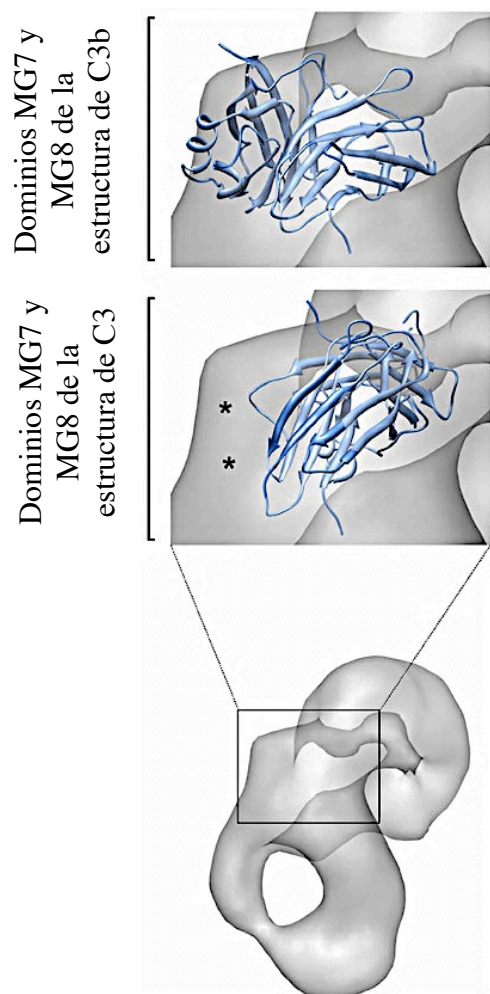


Fig. 4.1.12 Estructura 3D de iC3b. Estructura 3D de iC3b mostrada como una densidad en gris transparente, donde se han ajustado los anillos MG de C3b (código PDB ID 2I07) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) (panel superior) y C3 (código PDB ID 2A73; azul) (Janssen BJ, *et al.*, 2005) (panel inferior). El anillo MG de C3 presenta un peor ajuste en la estructura de iC3b, dejando zonas de densidad electrónica no cubiertas (marcadas como *).

El dominio C345c pudo ser fácilmente identificado en la parte superior del anillo MG, pero a este nivel de resolución no se pudo determinar su orientación precisa. Dado que en trabajos previos se ha descrito que la orientación del dominio C345c tiene cierta movilidad (Gross P, *et al.*, 2008), desplazamos ligeramente este dominio para acomodarlo a la densidad electrónica del mapa obtenido en este trabajo (**Fig. 4.1.13**, naranja). El dominio TED y parte del dominio CUB fueron localizados en la parte superior de iC3b, próximo a C345c, gracias a que esta densidad aparece como una masa independiente del anillo de MG y del dominio C345c. La resolución del volumen de ME, sin embargo, no permitió el posicionamiento exacto de los dominios TED y CUB de la estructura compacta de C3b.

El modelado basado en el ajuste computacional de las estructuras atómicas en la densidad de ME sugiere claramente que el dominio TED, que aparece desplazado en C3b

y lejos del dominio C345c, se posiciona en iC3b en las proximidades de C345c (**Fig. 4.1.13**, verde). Además, la densidad situada entre el dominio TED y el extremo C-terminal del dominio MG7 podría contener el resto del dominio CUB (**Fig. 4.1.13**, rojo).

4.1.3 Estructura de iC3b en solución, obtenida mediante SAXS

Con el objetivo de corroborar los resultados de microscopía electrónica, se llevó a cabo un experimento en solución, y en colaboración con el grupo de M. Cristina Vega del CIB-CSIC, se diseñaron experimentos de SAXS cuyo objetivo fue determinar el contorno de C3, C3b e iC3b utilizando muestras purificadas homogéneamente (**Fig. 4.1.1, A**). Los parámetros calculados de manera independiente a partir de los datos experimentales de SAXS fueron coherentes con los valores teóricos calculados para las estructuras atómicas de C3 y C3b publicadas (Janssen BJ, *et al.*, 2005), (Janssen BJ, *et al.*, 2006) y también estaban en consonancia con la estructura de ME de iC3b resuelta en este trabajo (**Materiales y Métodos y Tabla 4.1**).

Muestras		R_G^* , Å	$D_{max}^†$, Å	Masa molecular (SAXS), kDa
SAXS	C3	49.90 ± 0.04	~175	~181
	C3b	56.30 ± 0.06	~197	~169
	iC3b	49.5 ± 0.1	~183	~164
ME	iC3b	48.0	~154	n.a.
XRD	C3	51.8	158	n.a.
	C3b	54.8	172	n.a.

* R_G Radio de giro para datos de SAXS y parámetros calculados de estructuras de ME, XRD y difracción de Rayos-X.
 $† D_{max}$ Media experimental de datos de SAXS y parámetros calculados a partir de estructuras de ME y XRD.

Tabla 4.1 Comparación de resultados entre las diferentes técnicas. Parámetros independientes al modelo obtenidos a partir de datos de SAXS y parámetros teóricos calculados a partir de ME y estructuras de difracción de Rayos-X.

El análisis de baja resolución del SAXS indica que las tres moléculas en solución tienen estructuras bien definidas, y muestran una flexibilidad conformacional limitada. El tamaño de C3, C3b e iC3b calculado a partir de los datos de SAXS muestran un radio de giro y una dimensión de longitud significativamente más bajos de los que cabría esperar

para especies altamente ordenadas (**Materiales y Métodos**). Las curvas teóricas de dispersión para estructuras cristalinas conocidas, fueron calculadas y comparadas con los datos experimentales. El ajuste de los datos experimentales se comportó de manera más precisa, cuando las estructuras se consideraron como un cuerpo rígido. Las funciones de distribución entre pares de distancias calculadas de los datos de SAXS para C3 y C3b, y de SAXS y ME para iC3b (**Fig. 4.1.13, A**), así como los modelos promedio construidos *ab initio* para cada una de las muestras (**Fig. 4.1.13, B**), refuerzan la idea de que iC3b muestra una conformación significativamente más compacta que C3 y C3b.

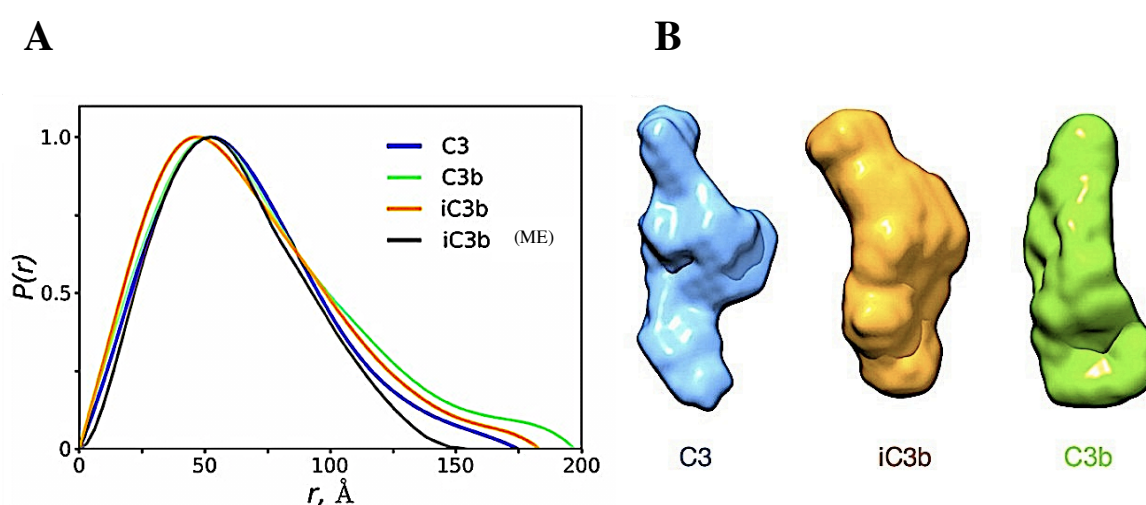


Fig. 4.1.13 Estructura global de iC3b obtenida mediante SAXS. (A) Funciones $P(r)$ para C3 (azul), C3b (verde), e iC3b (naranja) calculada a partir de los datos de SAXS. La función $P(r)$ para la estructura de ME de iC3b (gris) fue calculada a partir de un modelo. Las funciones $P(r)$ se encuentran normalizadas a la unidad. La intersección de cada función con el eje de abscisas de la media experimental genera el diámetro máximo. $P(r)$, distribución de pares de distancias. (B) Vistas características de los modelos *ab initio* de C3, iC3b y C3b, siguiendo el mismo esquema de colores que en (A).

4.2 Caracterización bioquímica y estructural de C3-16.4

4.2.1 Generación de anticuerpos monoclonales frente a C3

En el grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba (laboratorio de Patología Molecular y Genética del Complemento del CIB-CSIC) se diseñó una estrategia encaminada a identificar anticuerpos monoclonales (mAbs) que pudieran reconocer alguna de las regiones relevantes en diferentes fragmentos activados de C3. En este contexto, inmunizaron hembras de ratón C57BI/6 deficientes en C3 con una mezcla de fragmentos humanos C3b, iC3b y C3dg. Obtuvieron hibridomas que se prepararon siguiendo procedimientos estándar. Mediante esta estrategia se emplearon ratones deficientes en C3 para ayudar a la reactividad frente a fragmentos de C3 humanos, estrechamente relacionados con los mismos en ratón, y que, por lo tanto, son los más conservados evolutivamente. En una etapa posterior, seleccionaron los hibridomas en base a su capacidad de reconocimiento de los fragmentos de C3, empleando para ello una colección de proteínas purificadas (C3, C3b, iC3b, C3c y C3dg), ensayos de ELISA, y diluciones seriadas de los mAbs y metodologías estándar (explicado más detalladamente en Materiales y Métodos). Por último, se seleccionaron cuatro clones (C3-12.17, C3-42.3, C3-16.4 y C3-12.2) que reconocían diferentes fragmentos de C3 (Tabla 4.2).

mAbs	Isotipo	Reconocimiento de fragmento
C3-16.4	IgG1	C3b, iC3b, C3c
C3-12.17	IgG2a	C3b, iC3b, C3c
C3-42.3	IgG2a	C3b, iC3b, C3c
C3-12.2	IgG1	iC3b C3dg, C3d

Tabla 4.2. Caracterización de los mAbs de estudio. Se muestran los clones seleccionados en los que se definieron los fragmentos reconocidos por cada mAb mediante WB. Posteriormente, en experimentos de ME se localizaron cada uno de los dominios de C3b e iC3b que reconocían cada anticuerpo.

Una parte importante del trabajo realizado en esta tesis se centró en el uso de la microscopía electrónica (ME) para caracterizar los epítomos reconocidos por estos anticuerpos monoclonales (mAbs). Para ello, se determinó la estructura 3D de inmunocomplejos entre C3b, y el fragmento Fab de los mAbs.

- **Estructura de un anticuerpo monoclonal (mAb)**

El primer paso para determinar la estructura de los inmunocomplejos de iC3 y C3b fue caracterizar la estructura del anticuerpo monoclonal. No obstante, para la generación de los inmunocomplejos empleamos tan solo la región de unión al antígeno, fragmento Fab, compuesto de una región constante y otra variable, de cada una de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo, en este caso C3-12.2 (**Fig. 4.2.1, A**). La estructura globular del anticuerpo es de tamaño similar a C3 y genera estructuras más complicadas de analizar. Utilizar tan solo la parte Fab del mAb nos permitió una localización más precisa (**Fig. 4.2.1, B**).

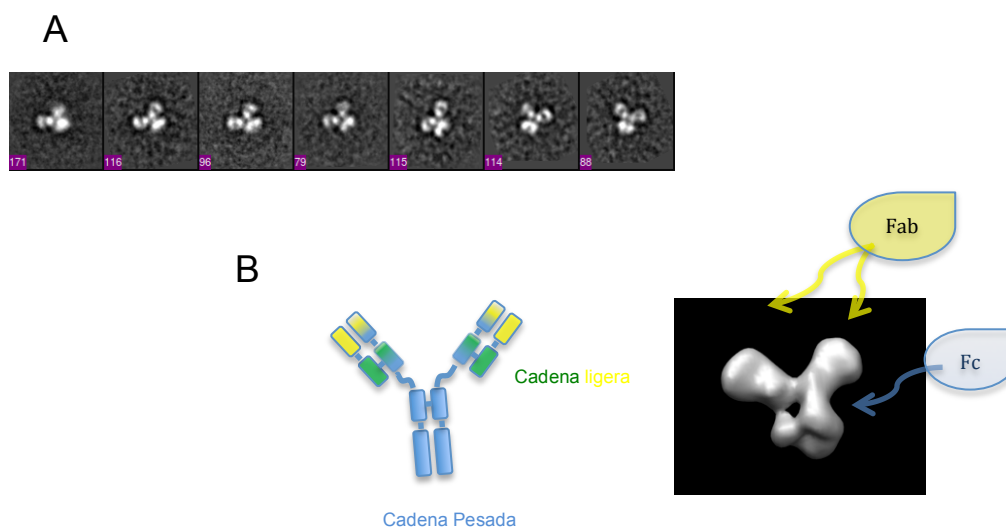


Fig. 4.2.1 Arquitectura 3D de un anticuerpo monoclonal (mAb). (A) Medias 2D libres de referencia correspondientes a diferentes vistas frontales en forma de Y, que eran las vistas mayoritarias. (B) A la izquierda, representación de la estructura típica de un Ab. A la derecha, vista frontal de la estructura 3D del mAb C3-12.2 con la región constante Fc y las dos regiones Fab de 50 kDa, donde se aloja la región hipervariable específica para cada uno de los anticuerpos monoclonales empleados. Los fragmentos Fabs fueron empleados para generar los inmunocomplejos con iC3b y con C3b.

4.2.2 Generación del fragmento Fab de C3-16.4

El fragmento Fab generado a partir de mAb C3-16.4 fue analizado mediante SDS-PAGE, en condiciones reducidas y no reducidas, y tinción con azul de Coomassie (**Fig. 4.2.2, A**). De esta manera se comprobó la pureza y estabilidad del Fab. Además, mediante WB y ELISA se caracterizó la reactividad de este fragmento, dado que un exceso en los tiempos de incubación en la columna de Ficina utilizada en la generación del fragmento Fab puede disminuir drásticamente la inmunorreactividad del Fab. Por otro lado, se generó iC3b a partir de C3b, y se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular (**Fig. 4.2.2, B**).

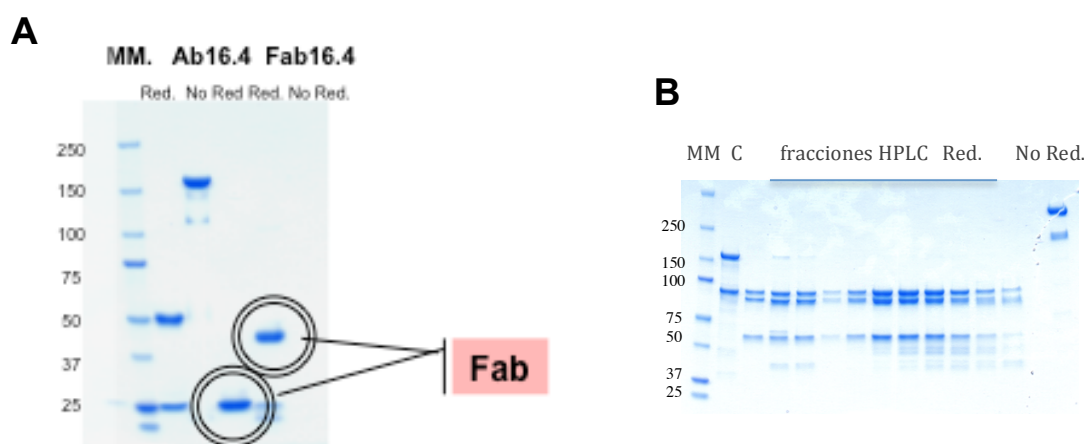


Fig. 4.2.2. Análisis del fragmento Fab 16.4 y purificación de iC3b. (A) Gel SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del fragmento Fab 16.4 purificado. (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie del corte proteolítico de C3b para generar iC3b y fracciones correspondientes a la cromatografía de exclusión molecular utilizada para purificar iC3b.

4.2.3 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Para resolver la estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4) mediante ME se purificó el complejo mediante cromatografía de exclusión molecular. Para la formación de este inmunocomplejo se mezclaron 6 μg de iC3b a 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, generado tras el corte de C3b (**Fig. 4.2.2, B**), y 9 μg del fragmento Fab C3-16.4 purificado a una

concentración de 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C a una relación molar 1:1,5 antes de inyectarlo en la columna Superdex 200 PC 3.2/30 (*GE Healthcare*).

El perfil de elución mostró un primer pico, de mayor masa molecular, donde se esperaba encontrar el inmunocomplejo (**Fig. 4.2.3, A**), en comparación con los perfiles de elución de las proteínas individuales. Las fracciones B10 y B9 que contenían el complejo fueron utilizadas para preparar rejillas de ME (**Fig. 4.2.3, B**).

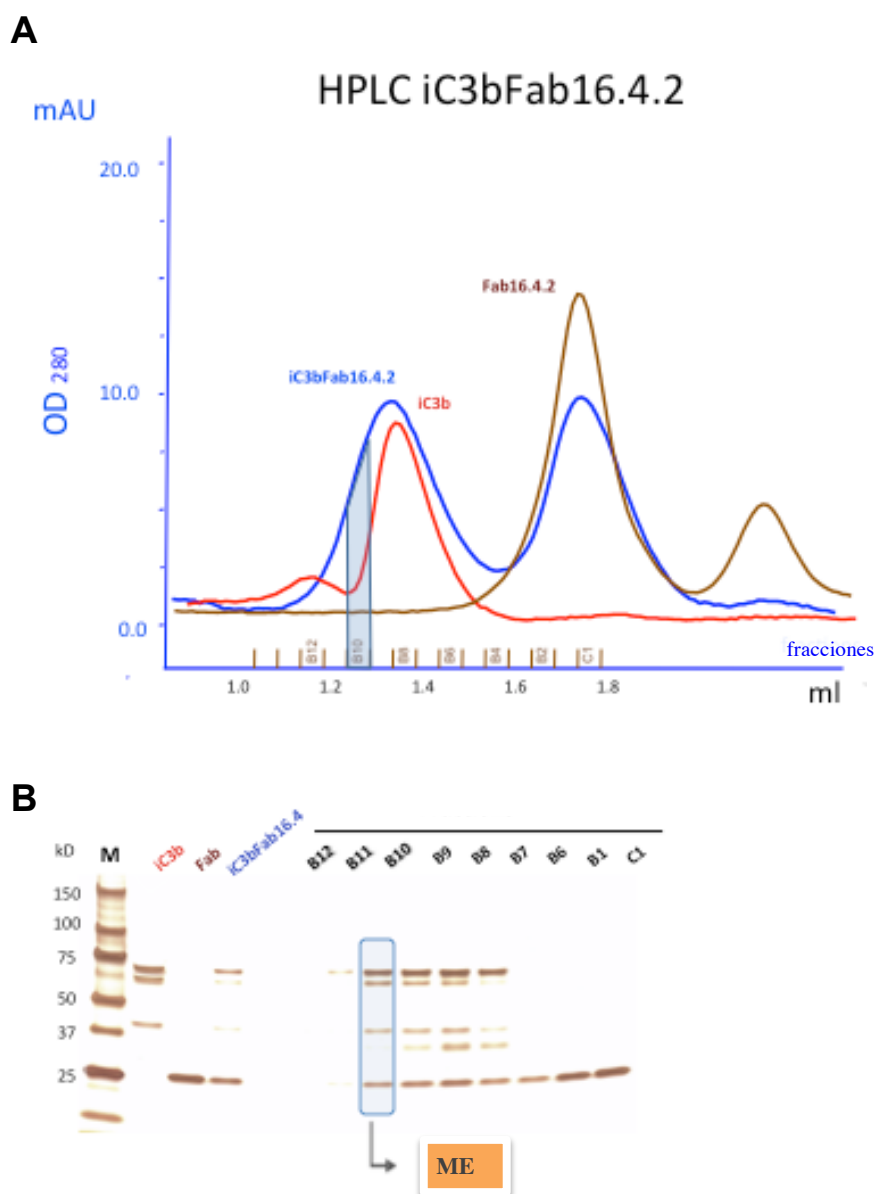


Fig. 4.2.3 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4). (A) Cromatogramas correspondientes a la filtración en gel de iC3b (en rojo), Fab-16.4 (en marrón), y de iC3b/Fab (C3-16.4) (azul). (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato plata de las muestras utilizadas en (A) y de las fracciones de la cromatografía de iC3b/Fab (C3-16.4). Se indica la fracción B10, utilizada en experimentos de ME.

4.2.4 Microscopía Electrónica del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

El complejo iC3b/Fab (C3-16.4) purificado mediante filtración en gel se analizó en el ME, se seleccionó una región homogénea, con una concentración y pureza óptima, para la adquisición de datos (**Fig. 4.2.4, A**). Se seleccionaron partículas individuales que fueron procesadas a nivel 2D mediante su clasificación, alineamiento y promediado utilizando los paquetes informáticos EMAN (Ludtke SJ, 2010) y EMAN2 (Tang G, *et al.*, 2007) (**Fig. 4.2.4, B y C**). En el análisis 2D de las imágenes se apreciaba con claridad la interacción del Fab con la molécula de iC3b, así como su localización (**Fig. 4.2.4, D**).

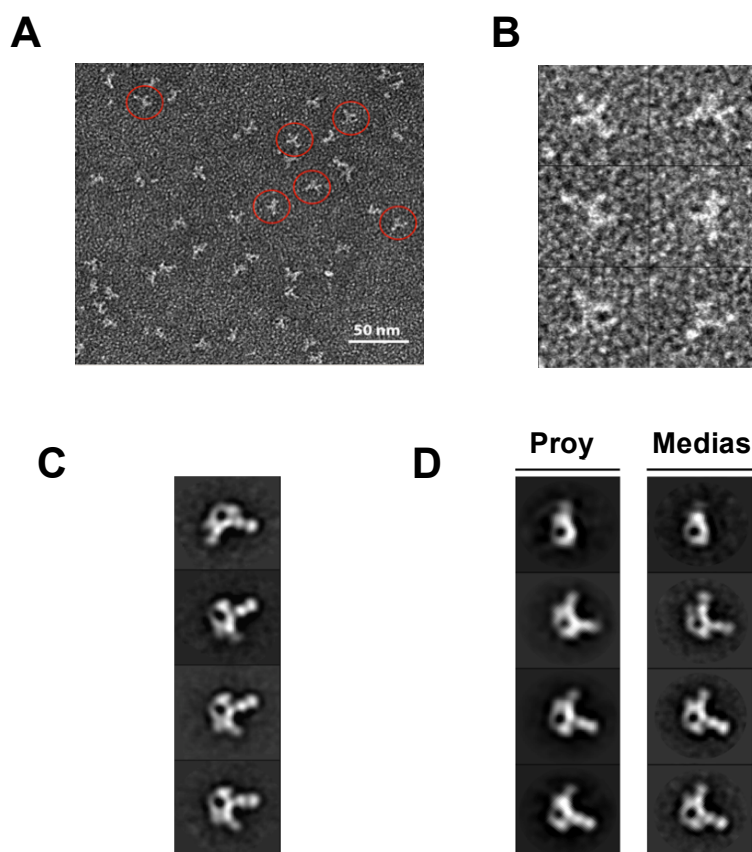


Fig. 4.2.4 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4). (A) Micrografía el complejo iC3b/Fab (C3-16.4) analizada mediante tinción. Barra de escala, 50 nm. (B) Selección de partículas individuales del complejo. (C) Medias 2D libres de referencia. (D) Medias y proyecciones asociadas correspondientes a la estructura 3D reconstruida para el inmunocomplejo.

4.2.5 Estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4)

Para reconstruir la estructura del complejo iC3b/Fab (C3-16.4), los datos experimentales fueron refinados utilizando diferentes modelos 3D iniciales. Se refinó de manera independiente: un modelo inicial generado con el programa EMAN2 (Tang G, *et al.*, 2007) a partir de las medias 2D libres de referencia, el volumen correspondiente a la estructura de iC3b previamente descrito, y por último un mapa generado tras filtrar a baja resolución una estructura atómica de iC3b unido a un fragmento Fab (Harris LJ, *et al.*, 1997) (**Fig. 4.2.5, A**). Cada uno de los pasos del refinamiento se realizó de manera supervisada, y tras analizar el procesamiento completo se seleccionó aquel volumen inicial que presentaba una mejor evolución y en el que la estructura atómica de iC3b se ajustara bien. Asimismo, las clases se debían asociar convenientemente a las proyecciones del modelo 3D.

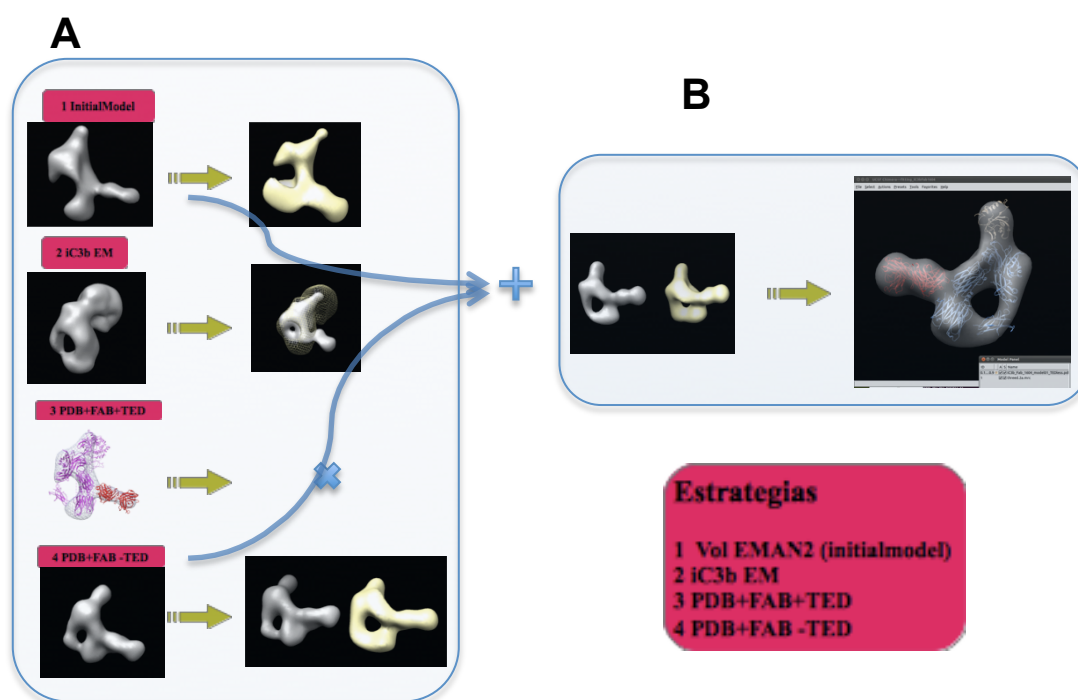


Fig. 4.2.5. Estrategias de procesamiento del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4). (A) Modelos iniciales utilizados en el refinamiento: modelo inicial obtenido en EMAN2 (Tang G, *et al.*, 2007) (1), estructura de ME de iC3b (2), estructura atómica de iC3b unido a Fab y filtrada a baja resolución (3 y 4). (B) La estrategia final consistió en una combinación de los volúmenes iniciales 1 y 4 (modelo a partir de molde Gaussiano y PDB de C3 con el Fab).

En vista de los volúmenes obtenidos tras el refinamiento de cada uno de los modelos iniciales, y con el objetivo de obtener un modelo más completo, se utilizó una estrategia en la que se combinaron dos de los modelos iniciales, suma del modelo inicial obtenido en EMAN2 con el PDB de iC3b (**Fig. 4.2.5, B**). El modelo suma de estos dos, se utilizó nuevamente para llevar a cabo el refinamiento con los datos experimentales. Tras varias rondas de refinamiento se llegó a una estructura final a 30 Å (**Fig. 4.2.6**). Mediante el ajuste de la estructura atómica del anillo MG en el mapa de densidad electrónica obtenido, pudimos precisar con mayor detalle la zona de unión del Fab, situada en torno a la región comprendida en MG2-MG6 que corresponde a la parte gruesa del anillo de MG.



Fig. 4.2.6 Estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4). A la derecha, vista cenital de la estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4). En el centro, vista frontal, y a la izquierda vista especular de la misma. En cada una de las vistas se representa la estructura atómica del anillo MG de iC3b ajustada en los mapas de ME (en azul) y la estructura atómica de un fragmento Fab encajada en la densidad electrónica correspondiente (en magenta).

- **Validación de la estructura de iC3b/Fab (C3-16.4)**

La validación de la estructura 3D se realizó utilizando el paquete informático XMIPP (Sorzano C.O, *et al.*, 2004), mediante el cual se representó la cobertura angular del conjunto de imágenes experimentales que conforman la estructura obtenida, la cual era suficientemente amplia (**Fig. 4.2.7-A**). La resolución de la estructura se realizó mediante correlación de capas de Fourier, utilizando el valor de FSC=0,5 que indicaba una resolución de 30 Å (**Fig. 4.2.7-B**).

Las estructuras atómicas del anillo MG de C3 (código PDB 2A73) (Janssen BJ, *et al.*, 2005) y C3b (código PDB 2I07) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) se ajustaron a la densidad electrónica, mostrando un coeficiente de correlación cruzada >0.8 que aportaba mayor validez al modelo obtenido.

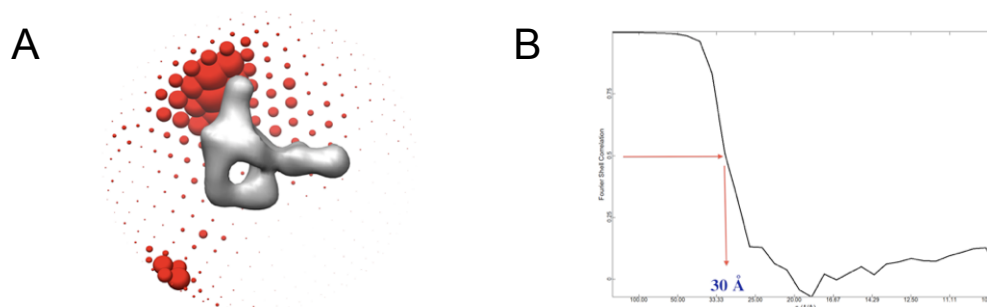


Fig. 4.2.7 Validación y resolución de la estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16.4). (A) Conjunto de proyecciones de los datos experimentales que conforman el modelo 3D. El ángulo de Euler de cada imagen se representa como una esfera roja de tamaño proporcional al número de imágenes asignadas a cada orientación tras el refinamiento angular (B) Representación gráfica del valor FSC. Se indica la resolución de la estructura del inmunocomplejo a 30 Å siguiendo el criterio de FSC=0.5.

4.2.6 Estructura 3D del inmunocomplejo C3b/Fab (C3-16.4)

Siguiendo una estrategia similar a la utilizada para reconstruir la estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-16-04), se mapeó el sitio de unión del anticuerpo C3-16.4 a las moléculas C3b. En esta tesis no incluimos los resultados de la microscopía ni la caracterización 2D, mostrándose únicamente la estructura 3D resuelta de los complejos formados entre C3b y el fragmento Fab de C3-16.4.

La estructura 3D del inmunocomplejo con C3b nos sirvió de gran ayuda para compararla con el inmunocomplejo de iC3b y el Fab de C3-16.4 (**Fig. 4.2.8, A-B**). Comparando ambas estructuras pudimos demostrar con mayor claridad que el Fab C3-16.4 reconoce una región en la parte gruesa del anillo MG, en torno a los dominios MG2 y MG6, y que en C3b aparece proyectada hacia el frente de la molécula (**Fig. 4.2.8, A**).

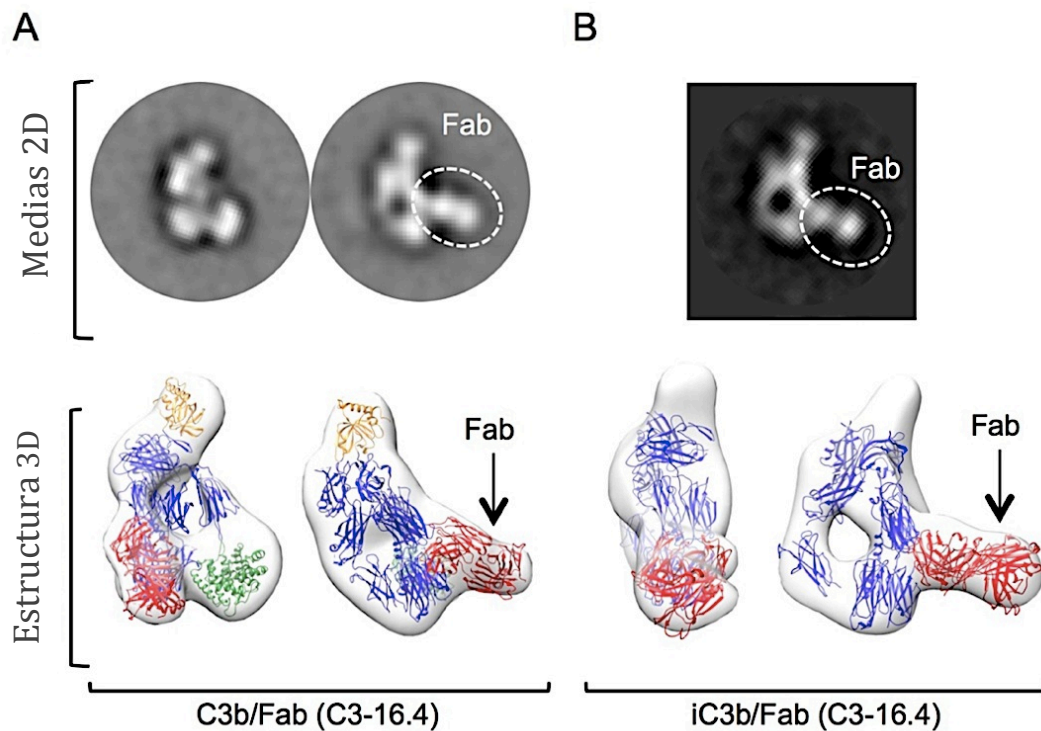


Fig. 4.2.8 Estructura de inmunocomplejos de C3-16.4. (A) Arriba, medias 2D representativas obtenidas tras promediar varios cientos de imágenes de ME de complejos de C3b y C3-16.4. La localización del Fab se indica mediante una elipse de líneas discontinuas blancas. Abajo, dos vistas de la estructura a media resolución de la estructura del complejo C3b/Fab mostrado como densidad blanca transparente. Las estructuras fueron interpretadas tras el ajuste de las estructuras cristalinas de C3b (PDB 2I07) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) y una estructura representativa de un Fab (PDB 1IGT) (Harris LJ, *et al.*, 1997). (B) Media representativa (arriba), y estructura 3D (abajo) de Fab (C3-16.4) unido a iC3b. La localización del Fab se indica mediante una elipse de líneas discontinuas blancas. En la estructura de iC3b, también se localiza la unión del Fab (C3-16.4) en la parte gruesa del anillo MG, en torno a los dominios MG2 y MG6.

4.3 Caracterización bioquímica y estructural C3-12.17

4.3.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

El primer paso para formar el inmunocomplejo fue generar el fragmento Fab, purificarlo mediante cromatografía, y comprobar su inmunorreactividad mediante ELISA y WB.

Para resolver la estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17) mediante ME se purificó el complejo utilizando una columna de cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 PC 3.2/30 (*GE Healthcare*). Previamente, efectuamos las carreras de cada proteína por separado en el HPLC para tener el patrón de elución de cada una de ellas. Para la formación de este inmunocomplejo se utilizó una muestra de iC3b comercial (*Calbiochem*) de 1,14 µg/µl, y el fragmento Fab purificado a una concentración de 0,5 µg/µl, que se incubó durante 30 minutos a 37 °C en una relación molar de 1:1,5 antes de inyectarlo en la columna. El perfil de elución muestra un primer pico en donde está contenido el inmunocomplejo, que se recoge en su mayoría en las fracciones B10 y B9 (**Fig. 4.3.1**). Estas fracciones fueron posteriormente utilizadas en los experimentos de ME. La formación del complejo fue deducida por la aparición de un nuevo máximo de absorbancia que eluía de la columna en un volumen correspondiente a una especie de mayor masa molecular, en comparación con la elución de las proteínas individualmente y también con estándares de calibración.

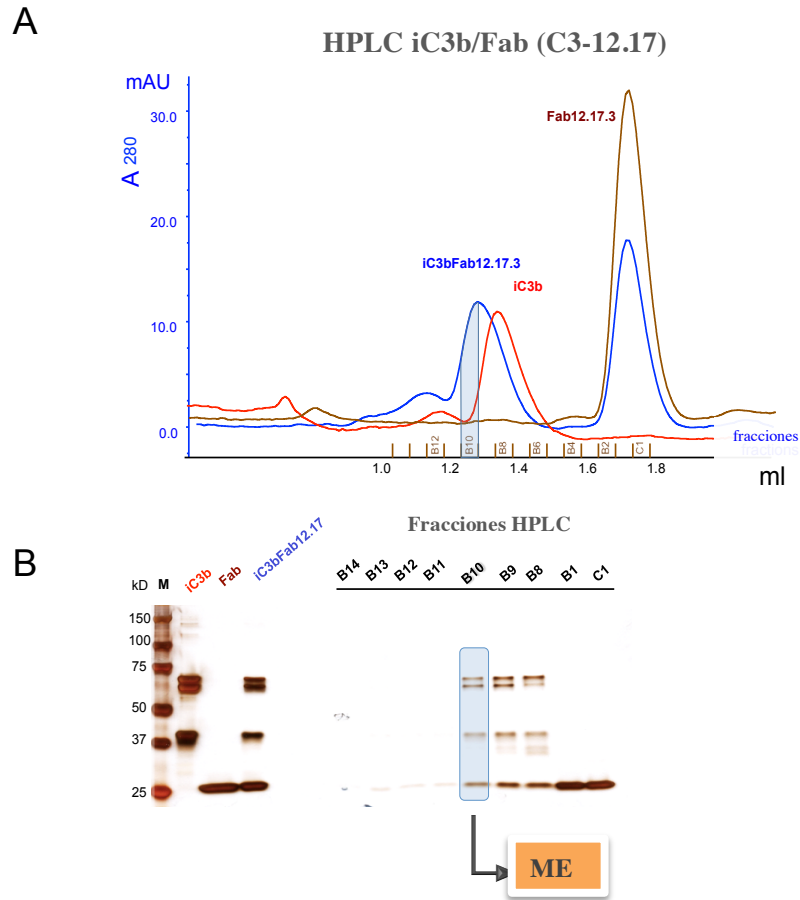


Fig. 4.3.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17). (A) Cromatografía de exclusión molecular de iC3b (curva en rojo), el Fab-12.17 (en marrón), y de la mezcla iC3b/Fab (C3-12.17) (en azul). (B) Análisis mediante SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata de las fracciones correspondientes a la cromatografía de iC3b/Fab (C3-12.17) en (A). Se señala la fracción B10, utilizada en los ensayos de ME.

4.3.2 Microscopía Electrónica del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

El complejo formado por iC3b y el fragmento Fab (C3-12.17) purificado mediante cromatografía de exclusión molecular fue analizado en el ME (**Fig. 4.3.2, A**). Se tomaron varias tandas de micrografías aplicando condiciones de mínima dosis, y se seleccionaron en torno a 30000 partículas individuales con el paquete de procesamiento de imagen EMAN2 (Tang G, *et al.*, 2007) de manera semiautomática (**Fig. 4.3.2, B**).

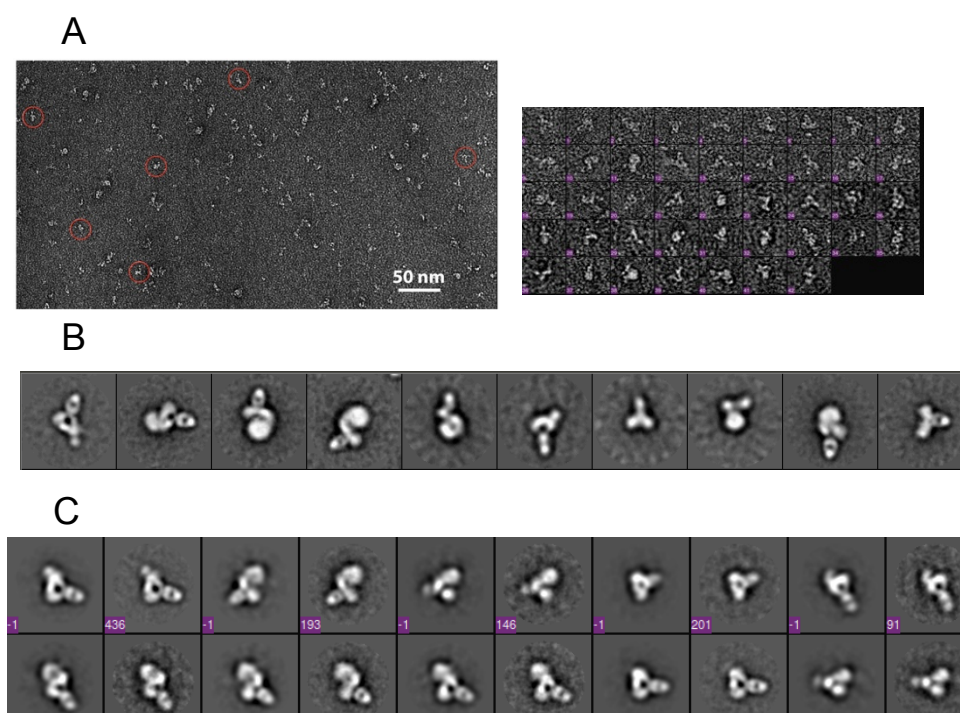


Fig. 4.3.2 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17). (A) Panel Izquierdo: Micrografía típica obtenida para la muestra iC3b/Fab (C3-12.17). Se señalan algunas moléculas en círculos rojos. Barra de escala, 50 nm. En el panel derecho se muestran partículas individuales. (B) Medias 2D libres de referencia. Se aprecia con detalle la unión del Fab. (C) Proyección (izquierda) del volumen final obtenido y media de las partículas asociadas (derecha).

La clasificación de las imágenes de partículas individuales del inmunocomplejo se realizó mediante el paquete de procesamiento de imagen EMAN (Ludtke, *et al.*, 1999), y EMAN2 (Tang G, *et al.*, 2007). Se seleccionaron un total de 100 medias 2D libres de referencia que se utilizaron para generar un volumen preliminar. A estas medias le incorporamos algunas medias procedentes de datos inclinados, sobre todo aquellas que contenían mayor información de la parte de la cabeza (TED). Con esta estrategia se pudo ver con claridad la unión y localización del Fab en iC3b (**Fig. 4.3.2, B y C**).

4.3.3 Estructura 3D del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17)

Como punto de partida para la reconstrucción de la estructura del complejo iC3b/Fab (C3-12.17) seleccionamos uno de los modelos iniciales generados en EMAN2 (Tang G, *et al.*, 2007), el cual presentaba un buen ajuste a la estructura atómica de iC3b, y en el

cual las medias, se asociaban convenientemente a las proyecciones. Además, se testaron diferentes estrategias de refinamiento, utilizando modelos iniciales generados colocando la densidad del Fab en diferentes posiciones de iC3b, y se estudió la consistencia de la estructura tras varias rondas de procesamiento (**Fig. 4.3.3**). Tras varias rondas de refinamiento, se seleccionó el modelo en el que mejor se ajustaban las estructuras atómicas a la densidad electrónica, obteniendo la estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17) a 29 Å (**Fig. 4.3.4**).

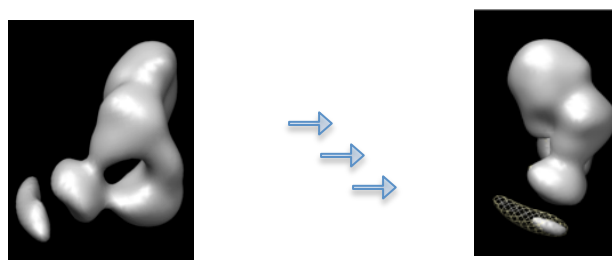


Fig. 4.3.3 Estrategias de procesamiento del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17). A la izquierda, uno de los volúmenes iniciales empleados para iC3b/Fab (C3-12.17). A la derecha, la estructura tras 6 pasos de refinamiento muestra un buen ajuste.

Mediante el ajuste de la estructura atómica del anillo MG en el mapa de densidad electrónica del complejo, se localizó la región de unión del fragmento Fab, situada próxima a los dominios MG3 y MG4, que corresponden a la parte fina del anillo, en el lado opuesto al sitio que mapea el Fab C3-16.4.



Fig. 4.3.4 Estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17). A la izquierda, vista cenital de la estructura en el centro del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17). A la derecha, la misma estructura rotando 180°. Se representa la estructura atómica de los dominios MG de iC3b ajustada en el mapa de ME. La región correspondiente al módulo TED-CUB se representa en la parte superior, si bien no se realizó un ajuste atómico de la estructura, por si pudiera presentar conformaciones adicionales a la aquí representada.

- **Validación de la estructura de iC3b/Fab (C3-12.17)**

De nuevo, se validó la estructura de ME obtenida para el inmunocomplejo utilizando el paquete de procesamiento XMIPP (Sorzano CO, *et al.*, 2004), comprobando una adecuada cobertura angular del conjunto de imágenes que conforman la estructura (**Fig. 4.3.5, A**). La resolución de la estructura se realizó mediante correlación de capas de Fourier, utilizando el valor de FSC= 0,5, para obtener un valor de 29 Å (**Fig. 4.3.5, B**).

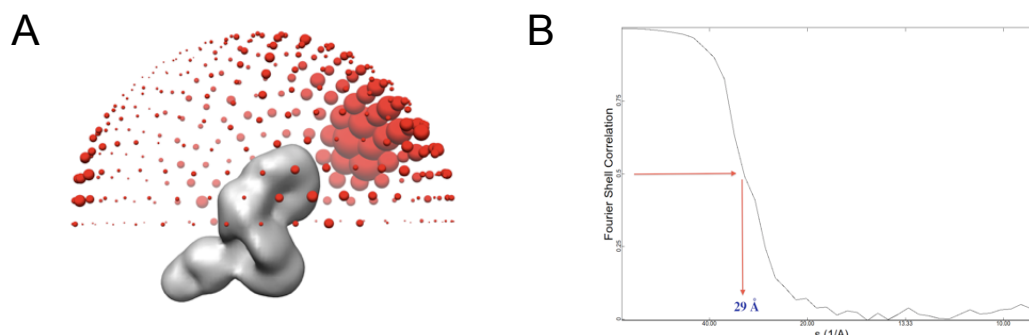


Fig. 4.3.5 Validación y resolución de la estructura del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.17). (A) Distribución angular de los datos experimentales sobre el mapa de ME obtenido. El ángulo de Euler de cada imagen se representa como una esfera roja de tamaño proporcional al número de imágenes asignadas a cada orientación tras el refinamiento angular. (B) Gráfica de representación de la resolución de la estructura del inmunocomplejo a 29 Å, tomando 0,5 como valor de FSC.

4.3.4 Estructura 3D del inmunocomplejo C3b/Fab (C3-12.17)

Para comprender con mayor detalle la base molecular de cómo el anticuerpo C3-12.17 inhibe el proceso de activación de C3, mapeamos el sitio de interacción de dicho anticuerpo sobre la molécula de C3b en lugar de iC3b. Siguiendo un protocolo similar al utilizado en el caso de iC3b/Fab (C3-12.17), la mezcla de C3b con un exceso molar del fragmento Fab fue purificada mediante cromatografía de exclusión molecular, y las fracciones correspondientes al inmunocomplejo se analizaron en el microscopio electrónico. Tras la toma de datos, se realizó el procesamiento 2D de las partículas individuales del complejo, observando claramente en las medias libres de referencia el fragmento Fab unido al anillo MG de C3b, aunque la posición en este caso era ligeramente diferente para C3-12.17 (**Fig. 4.3.6, A**) que la resuelta para C3-16.4 (**Fig. 4.2.8**), casi opuesta en el anillo MG.

La localización precisa del Fab en cada uno de los complejos C3b-Fab fue definida con mayor exactitud resolviendo la estructura 3D de los complejos a 30 Å de resolución, utilizando imágenes de partícula individual de los inmunocomplejos como punto de partida para el refinamiento 3D (**Fig. 4.3.6, B**).

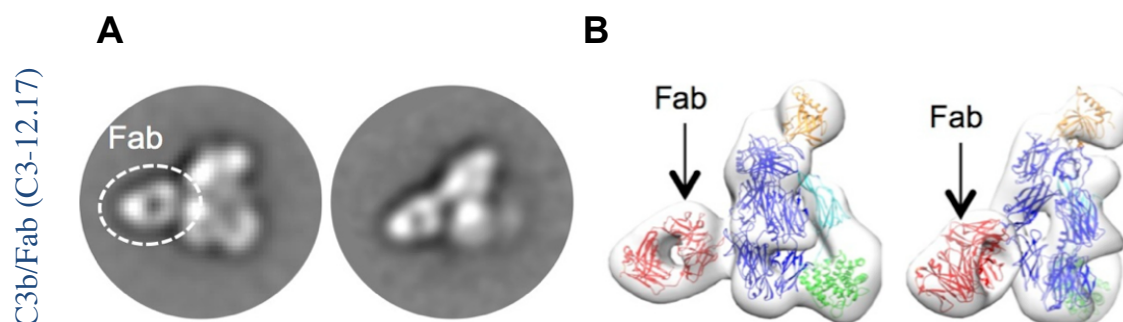


Fig. 4.3.6 Medias 2D y estructura 3D del inmunocomplejo C3-12.17. (A) Medias 2D representativas del complejo formado por C3b y el fragmento Fab C3-12.17. (B) Dos vistas representativas de la estructura a media resolución de los complejos C3b/Fab (C3-12.17). El mapa de densidad electrónica se muestra en blanco. Las estructuras fueron interpretadas tras ajustar las estructuras de cristalografía de C3b (**PDB 2I07**) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) y de un Fab (**PDB 1IGT**) (Harris LJ, *et al.*, 1997) representativo. El anillo MG se presenta coloreado en azul, el dominio TED en verde, C345C en naranja, y el Fab en rojo.

Para interpretar la estructura 3D obtenida, realizamos el ajuste de las estructuras atómicas del anillo MG de C3b y de un Fab en la densidad electrónica del modelo. Estos experimentos indicaban que el anticuerpo C3-12.17 reconoce una región próxima a los dominios MG3 y MG4. Al comparar esta interacción con la de C3-12.17 con iC3b, observamos que el anticuerpo reconocía la misma región en C3b e iC3b (**Fig. 4.3.7**).

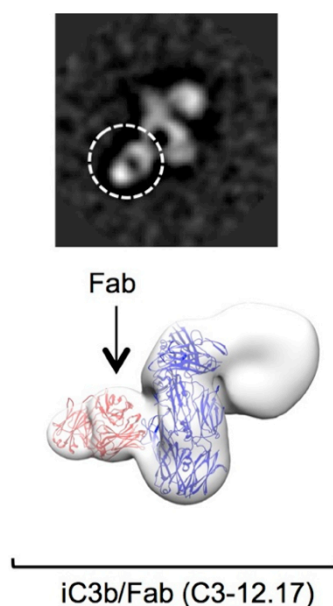


Fig. 4.3.7 Imagen representativa 2D (arriba) y estructura 3D (abajo) del fragmento Fab C3-12.17 unido a iC3b. La localización del Fab aparece marcada con un círculo de línea discontinua blanca. En la estructura 3D, iC3b aparece en la conformación descrita en Alcorlo (Alcorlo M, *et al.*, 2011), y se ajustó solamente la estructura atómica del anillo MG (en azul) y de un Fab (PDB 1IGT) (en rojo).

4.3.5 Estructura 3D del inmunocomplejo C3b/Fab(C3-42.3)

En el contexto de la caracterización estructural de los inmunocomplejos de C3-12.17, se estudió la interacción de un anticuerpo con una localización que mapeaba en una región muy parecida a la encontrada para C3-12.17. Siguiendo el mismo procedimiento descrito en los casos anteriores, se obtuvieron imágenes de ME del complejo entre C3b y el fragmento Fab (C3-42.3). En el procesamiento 2D y en la estructura 3D obtenida a media resolución, comprobamos la zona de interacción del mAb en la molécula de C3b (**Fig. 4.3.8**).

Para interpretar la estructura 3D obtenida mediante ME, realizamos el ajuste de las estructuras atómicas del anillo MG de C3b y de un Fab representativo en la densidad electrónica del complejo. Estas estructuras 3D revelaron que C3-12.17 y C3-43.2 reconocían dos posiciones próximas, aunque ligeramente distintas en el anillo MG, y en ambos casos, el fragmento Fab del mAb se proyectaba hacia la parte externa del anillo. En el caso de C3-42.3, la región de interacción con C3b se localizó en la proximidad de

los dominios MG4 y MG5. Estos sitios de interacción de C3-12.17 y C3-42.3 coinciden en la especificidad de unión, tanto en C3b, iC3b y C3c. Los fragmentos contienen los epítomos diana en el anillo MG (**Tabla 4.3**).

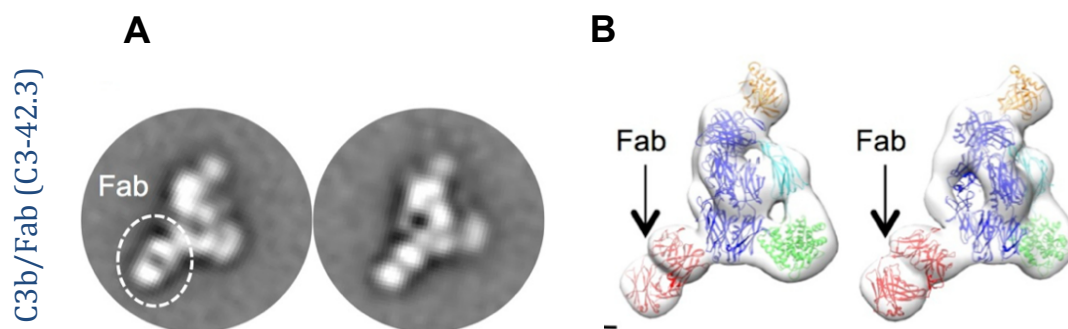


Fig. 4.3.8 Arquitectura del inmunocomplejo C3b/Fab (C3-42.3). (A) Medias 2D libres de referencia representativas del complejo. (B) Dos vistas representativas de la estructura 3D de los complejos C3b/Fab (C3-42.3). Los modelos de ME fueron interpretados tras ajustar las estructuras atómicas de C3b (PDB 2I07) y de un Fab representativo (PDB 1IGT). Se utiliza el mismo patrón de color que el seguido para el inmunocomplejo C3-12.17.

4.4 Caracterización bioquímica y estructural de C3-12.2

4.4.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2)

El primer paso para caracterizar la interacción entre iC3b y el anticuerpo C3-12.2 fue la generación del fragmento Fab, su purificación mediante cromatografía de exclusión molecular, y la comprobación de su inmunorreactividad mediante ELISA y WB. Para la formación del inmunocomplejo se utilizó una muestra de iC3b comercial (*Calbiochem*), 10 µg a 1,14 µg/µl, y el fragmento Fab, 12 µg purificado a una concentración de 0,25 µg/µl. La mezcla de ambos se incubó durante 30 minutos a 37 °C, a una relación molar de 1:3 antes de inyectarlo en la columna de exclusión molecular Superdex 200 PC 3.2/30 (*GE Healthcare*). El perfil de elución mostró un primer máximo de absorbancia que contenía el inmunocomplejo, tras su análisis mediante SDS-PAGE y tinción con

nitrato de plata (**Fig. 4.4.1**). Las fracciones en las que eluía el complejo (B10 y B9) fueron utilizadas posteriormente para la preparación de rejillas de ME.

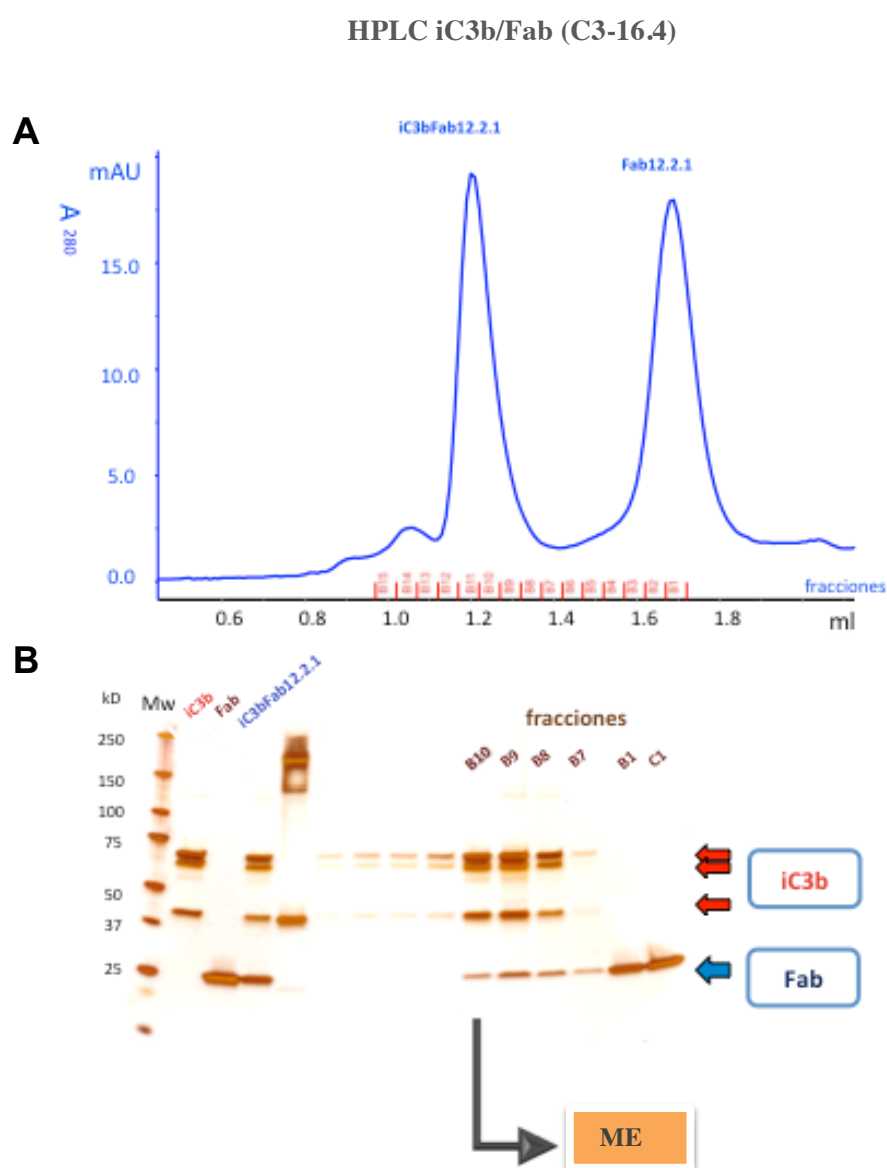


Fig. 4.4.1 Purificación del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2). (A) Perfil de elución correspondiente a la cromatografía de exclusión molecular. El primer pico de elución corresponde al complejo iC3b/Fab (C3-12.2). Se indica también el pico correspondiente al exceso de fragmento Fab libre. (B) Gel SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata de las fracciones del cromatograma en (A). Se indica la fracción B10, utilizada en los ensayos de ME.

4.4.2 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2)

Utilizando la fracción obtenida en la cromatografía de exclusión molecular que contenía el complejo iC3b/Fab (C3-12.2) se prepararon rejillas de microscopía electrónica, testando diferentes concentraciones de la muestra para establecer una dilución adecuada. Tras la exploración en el ME, se seleccionó una región homogénea, con una concentración y pureza óptima (**Fig. 4.4.2, A**), de la que se obtuvieron imágenes. Un total de 32808 partículas del complejo fueron extraídas y refinadas utilizando diferentes estrategias.

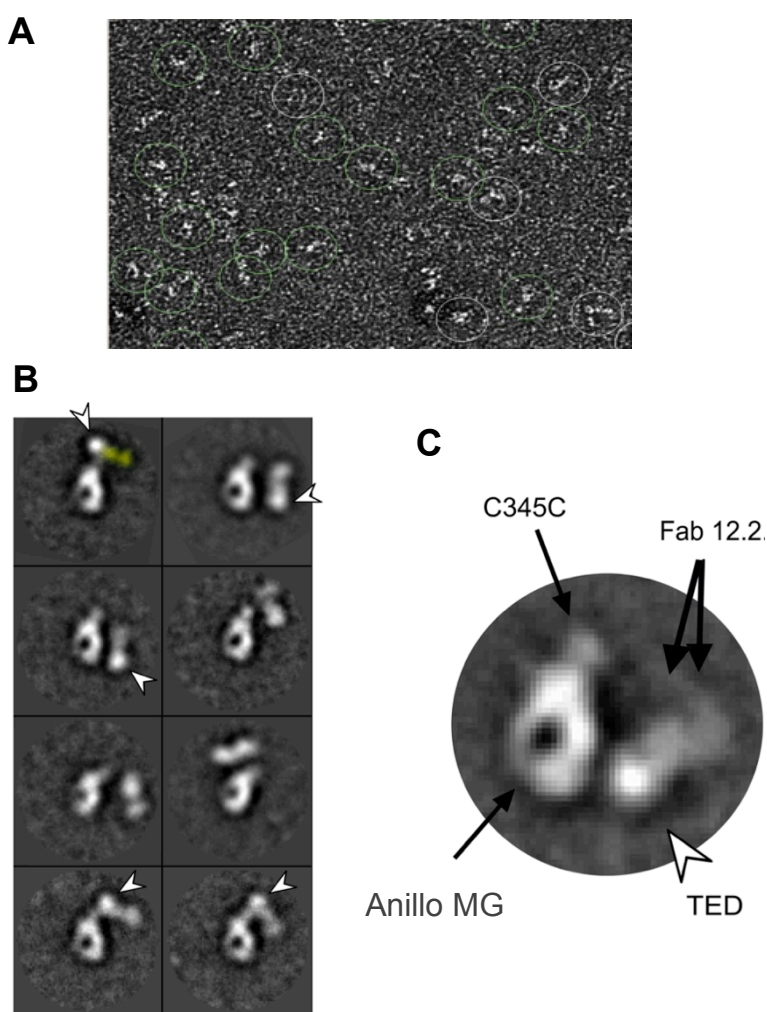


Fig. 4.4.2 ME del inmunocomplejo iC3b/Fab (C3-12.2). (A) Campo de ME del complejo de iC3b/Fab (C3-12.2). (B) Medias 2D libres de referencia del inmunocomplejo. La posición del dominio TED, al que se une el Fab-12.2, se indica mediante una flecha. (C) Imagen media típica, donde se indican los dominios de iC3b y la región de unión del anticuerpo monoclonal.

Las medias 2D obtenidas sugerían que el Fab interaccionaba con el dominio TED, pero este, al ser móvil, y tener la capacidad de ocupar diferentes posiciones alrededor de la estructura, sólo se pudo concluir que el fragmento Fab aparecía en posiciones distantes del anillo MG, haciendo difícil obtener un modelo 3D. Para generar medias 2D estructuralmente más homogéneas empleamos un algoritmo implementado en el paquete XMIPP (Sorzano CO, *et al.*, 2004), KenDerSom (del inglés, *Kernel Probability Density Estimator Self-Organizing Map*). Se hizo una selección de las mejores clases obtenidas con el comando CL2D (XMIPP3) (Sorzano CO, *et al.*, 2009), y por otra parte con el comando ML2D (en XMIPP 2.4) (Scheres, *et al.*, 2005). Las partículas contenidas en estas medias se volvieron a clasificar con el algoritmo KenDerSom, que generó un mapa auto-organizativo donde las partículas se organizaron en clases más homogéneas. De esta manera se obtuvo una mayor definición de la región del fragmento Fab en el inmunocomplejo (**Fig. 4.4.2 y 4.4.3**).

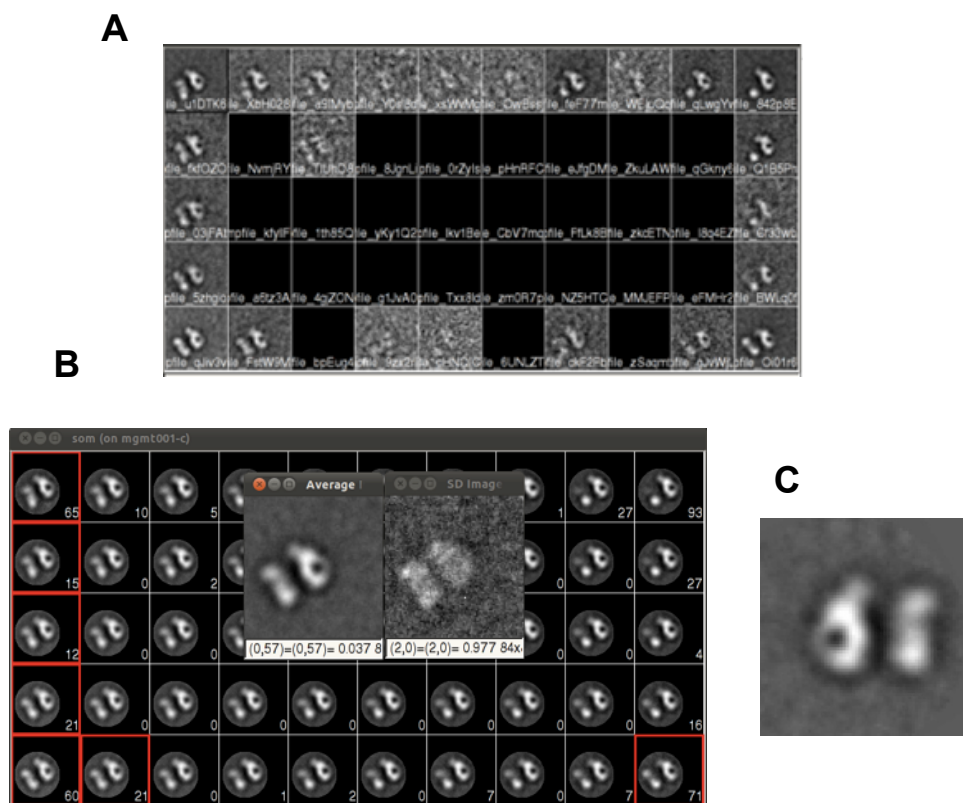


Fig. 4.4.3 Medias 2D de iC3b/Fab (C3-12.2) a partir de KenderSom. (A) Medias de las imágenes asignadas en cada mapa auto-organizativo generado para una de las medias donde el inmunocomplejo. (B) Selección de imágenes que conforman la media 2D del inmunocomplejo entre iC3b y el Fab de C3-12.2. (C) Imagen media 2D representativa del complejo iC3b-Fab tras la clasificación KerDenSom.

4.4.3 Estructura de inmunocomplejos C3-12.2

Para confirmar que la razón de la heterogeneidad encontrada en las medias libres de referencia del complejo iC3b/Fab (C3-12.2) se debía a que el Fab reconoce el dominio móvil TED, se incubó C3dg, fragmento de C3b formado básicamente por el dominio TED, con el fragmento Fab (C3-12.2), y el complejo se analizó mediante (Fig. 4.4.4). Los datos obtenidos se compararon con las imágenes obtenidas con las proteínas individuales. Estos análisis demostraron la formación de los complejos iC3b-Fab y C3dg-Fab, confirmando la localización del sitio de interacción del anticuerpo C3-12.2 en el dominio TED de iC3b (Fig. 4.4.2 y Fig. 4.4.3).

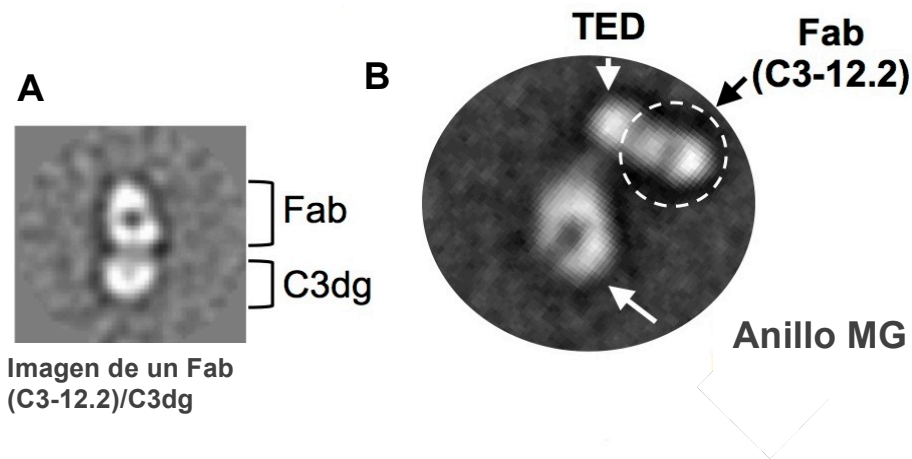


Fig. 4.4.4 Imagen 2D del complejo C3dg/Fab (C3-12.2). (A) Imagen media 2D representativa del complejo C3dg-Fab (C3-12.2), donde se señalan cada uno de los componentes (Fab y C3dg). (B) Media 2D representativa del inmunocomplejo entre el fragmento Fab (C3-12.2) e iC3b. La posición de los distintos dominios fue determinada mediante comparación con las estructuras previamente descritas de nuestro grupo.

Para completar la caracterización de los anticuerpos de estudio en este trabajo, en el grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba se llevaron a cabo experimentos *in vitro*, de ELISA y WB fundamentalmente, en los que se testaron diferentes combinaciones de los anticuerpos para determinar su capacidad de reconocimiento de distintos derivados de C3 (C3b, iC3b y C3dg). Estos ensayos se discuten brevemente en esta tesis, aunque no se describen detalladamente.

Estos experimentos concluyeron claramente que el anticuerpo C3-12.2 era el único de los cuatro mAbs estudiados que no reconocía C3b en ensayos ELISA. El anticuerpo reaccionó frente a la cadena α' 65 de iC3b y a los fragmentos que resultan del corte de

iC3b, C3dg y C3d (**Tabla 4.3**). Además, se comprobó que el anticuerpo no interaccionaba con C3c, confirmando que C3-12.2 no reconoce ninguna región del anillo MG. Los experimentos de WB demostraron la unión del mAb C3-12.2 a C3d (**Fig. 4.4.5**). C3-12.2 reconoce un epítipo presente en C3d, lo que ayudó a localizar de manera más precisa el epítipo reconocido por el anticuerpo en una región del fragmento C3d que solo se expone cuando C3b se corta a iC3b mediante fI.

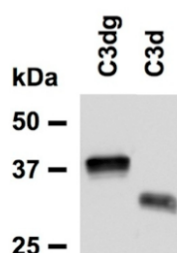


Fig. 4.4.5 Detección de fragmentos de C3 en WB por el anticuerpo C3-12.2. C3-12.2 reconoce específicamente la cadena α' 65 de iC3b y el fragmento C3dg en condiciones reducidas, y más específicamente un epítipo presente en C3d.

4.4.4 Resumen de los epítipos reconocidos por los anticuerpos de C3

Los resultados de los estudios estructurales realizados mediante ME y combinados con ensayos de Resonancia de Plasmón Superficial (SPR) y Western Blot (WB), aparecen recopilados en la **Tabla 4.3**. Los cuatro clones seleccionados (C3-12.17, C3-42.3, C3-16.4 y C3-12.2) reconocen diferentes fragmentos de C3. C3-12.17, C3-16.4, y C3-42.3 reconocen C3b, iC3b y C3c. Por otra parte, C3-12.2 reconoce iC3b, C3dg y C3d.

mAbs	Reconocimiento de fragmento	Reconocimiento de dominio	KD (M)	Ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Kd (s^{-1})
C3-16.4	C3b, iC3b, C3c	MG2, MG6	1,2 nM	$3,7 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^{-5}$
C3-12.17	C3b, iC3b, C3c	MG3, MG4	63 nM	$7,8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^{-5}$
C3-42.3	C3b, iC3b, C3c	MG4, MG5	0,73 nM	—	—
C3-12.2	iC3b, C3dg, C3d	CUB-TED	95 nM	$2,2 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^{-5}$

Tabla 4.3. Caracterización funcional de los cuatro mAbs. Se determinaron los fragmentos reconocidos por cada mAb, y la ME se utilizó para mapear el dominio en C3b/iC3b reconocido por el fragmento Fab de cada mAb. Las constantes de unión (KD), de asociación (Ka) y disociación (Kd) para C3b (en el caso de C3-16-4, C3-12.17 y C3-42.3) y para iC3b, en el caso de C3-12.2, fueron determinadas utilizando SPR.



5 Discusión

Uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral fue la determinación de la estructura 3D de iC3b, que en ese momento no se conocía en detalle. El conocimiento de la arquitectura de esta molécula permite comprender cómo se produce el corte proteolítico sobre C3b para generar iC3b, uno de los pasos más importantes en la vía alternativa de activación del complemento. En estudios previos a través de técnicas espectroscópicas, se había descrito que la formación de iC3b estaba acompañada de un cambio conformacional y sugería una reversión del paso de C3 a C3b. Aunque en contraste con estos datos, mediante microscopía electrónica se ha podido observar que el dominio TED, que contiene el grupo tioéster, no tiene una orientación precisa alrededor del fragmento C3c, lo que genera interesantes cuestiones acerca de la base estructural de muchas de las respuestas inmunológicas mediadas por iC3b.

5.1 Estructura de iC3b

5.1.1 Estructura de iC3b por ME-3D

Hasta hace poco tiempo la estructura 3D de la molécula de iC3b se ha mantenido poco clara, dificultando la comprensión del conjunto de reordenamientos estructurales del cambio de C3b a iC3b. Hace ya más de 25 años, utilizando técnicas espectroscópicas, se describió que la generación de iC3b venía acompañada de un cambio conformacional y en ese trabajo se sugirió una reversión del cambio visto en la conversión original de C3 a C3b ([Isenman DE, 1983](#)). En contraste, datos recientes de ME han mostrado que el dominio que contiene el tioéster (TED) en iC3b se estructura como una región sin una orientación concreta alrededor del anillo MG ([Gros P, et al., 2008](#)), ([Nishida N, et al., 2006](#)), lo cual genera interesantes cuestiones acerca de las bases estructurales de muchas de las respuestas inmunológicas en las que media iC3b. ([Gros P, et al., 2008](#)), ([Chen X, et al., 2010](#)), ([Ehlers MR, 2000](#)).

Varios estudios previos han ido estableciendo una completa y detallada vista estructural de la complejidad de la activación y regulación de la vía alternativa (AP) del complemento, que ilustra cómo estos procesos se producen a través de grandes reajustes estructurales ([Gros P, et al., 2008](#)), ([Rodríguez de Córdoba S, et al., 2011](#)), ([Forneris F,](#)

et al., 2010), (Janssen BJ, *et al.*, 2009), (Rooijackers SH, *et al.*, 2009), (Torreira E, *et al.*, 2009), (Wiesmann C, *et al.*, 2006), (Janssen BJ, *et al.*, 2006), (Torreira E, *et al.*, 2009), (Wu J, *et al.*, 2009) (**Fig. 5.1**).

C3 es una proteína globular de 180 (kDa) cuya estructura resulta de un ajuste combinado de varios dominios: un núcleo de 8 dominios MG homólogos formando un anillo, un dominio TED que contiene un tioéster reactivo que conecta con el núcleo de MG a través de un dominio CUB, el dominio C345c que participa en la interacción con fB y el dominio anafilotoxina N-terminal (Gros P, *et al.*, 2008), (Rodríguez de Córdoba S, *et al.*, 2011). La activación de C3 para generar C3b es el paso central y más importante en la activación del complemento, que se caracteriza por un gran desplazamiento conformacional del dominio TED que expone un grupo tioéster reactivo que se encuentra protegido en C3 nativo (Wiesmann C, *et al.*, 2006), (Janssen BJ, *et al.*, 2006). Asimismo, estos reajustes conformacionales generan sitios de unión para un conjunto de moléculas como el componente fB de la convertasa de AP (Rooijackers SH, *et al.*, 2009), (Torreira E, *et al.*, 2009), y los reguladores del complemento fH, DAF, MCP y CR1 (Gros P, *et al.*, 2008), (Wu J, *et al.*, 2009).

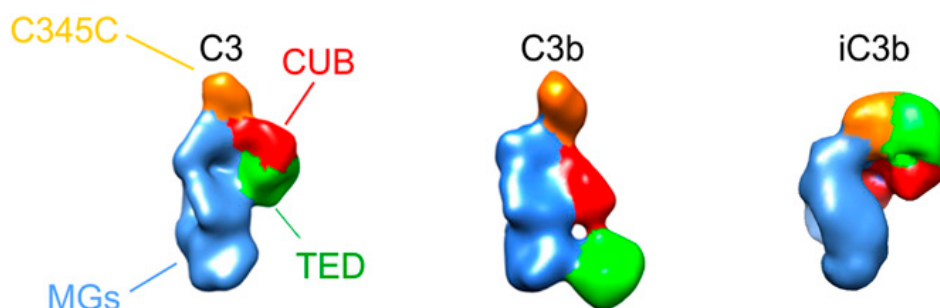


Fig. 5.1 Arquitectura Molecular de iC3b. Las estructuras atómicas de C3 (código PDB **2A73**) (Janssen BJ, *et al.*, 2005) y C3b (código PDB **2I07**) (Janssen BJ, *et al.*, 2006) se filtraron a una resolución similar a la estructura de iC3b (código EMD **1908**) obtenida en este trabajo mediante ME.

En esta tesis describimos un reajuste conformacional que tiene como resultado la inactivación de C3b, eliminando de este modo las funciones efectoras que caracterizan a esta molécula. Mediante EM y SAXS demostramos que el corte de C3b a iC3b genera una única conformación, distinta de C3 y C3b. La conformación global de iC3b es

similar a la de C3b en la parte del anillo MG. Por otra parte, el dominio TED y parte del dominio CUB se mueven a posiciones equivalentes a las que ocupan en C3 (**Fig. 5.1**). Estos resultados reafirman trabajos previos, basados en espectroscopia, que sugerían un cambio conformacional en iC3b revirtiendo parcialmente a la conformación similar a C3 (Isenman DE, 1983). Es importante recordar que el dominio TED cuando se localiza en superficie se encuentra bloqueado a través del enlace tioéster. Por lo tanto, es el resto de la molécula de iC3b la que en realidad se mueve alrededor, mientras el TED permanece estático. Esto podría tener implicaciones en el reconocimiento de iC3b a los reguladores del complemento CR2, CR3, y CR4 puesto que esto provoca que la molécula exponga una cara diferente en la superficie celular.

En contraste con estos resultados, estudios previos de iC3b han mostrado que el dominio TED se encuentra orientado aleatoriamente con respecto al anillo MG (Gros P, *et al.*, 2008), (Nishida N, *et al.*, 2006). Una de las razones que podría estar detrás de estas diferencias sería que las regiones CUB y TED en iC3b poseen una fuerte tendencia a reajustarse en la conformación que se describe en esta tesis, aunque algunos autores (Nishida N, *et al.*, 2006) capturaron otros posibles estados conformacionales generados después del corte de C3b.

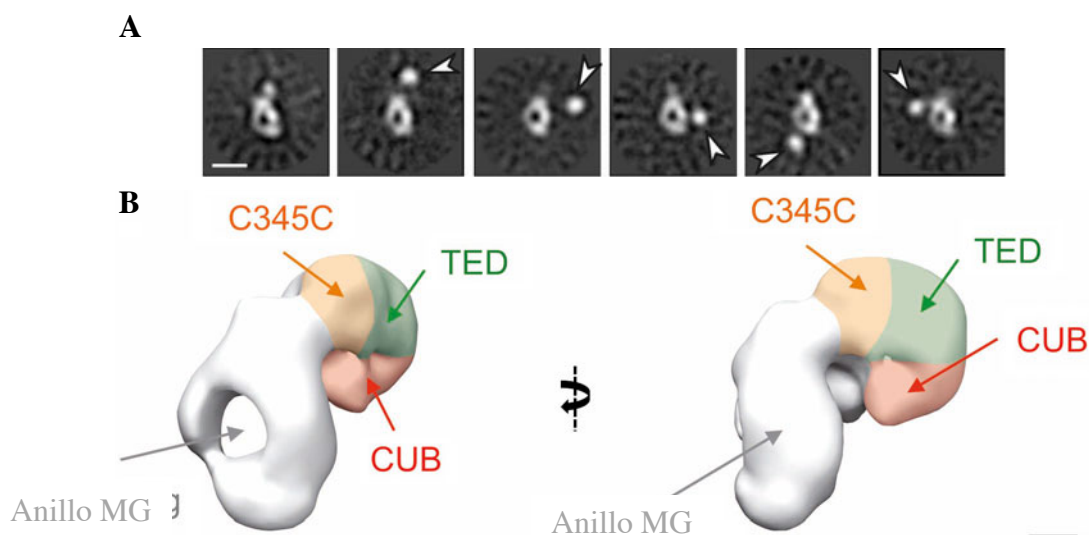


Fig. 5.2 Estructura 3D de iC3b. (A) Medias 2D de iC3b mostrando la flexibilidad conformacional del TED moviéndose alrededor del anillo MG. Estas medias son similares a las obtenidas en el trabajo de Nishida (Nishida N, *et al.*, 2006). Barra de escala 10 Å. (B) Dos vistas de la estructura de iC3b obtenida mediante ME (código EMD-1908) La localización exactas de los dominios C345c (naranja), CUB (rojo) y TED (verde) en la parte de arriba del anillo, son las que se han sugerido en Alcorlo *et al.* (Alcorlo M, *et al.*, 2015), pero solo se sitúan a nivel especulativo a la resolución de esta estructura 25 Å.

5.1.2 iC3b muestra distintas conformaciones dependiendo del estado

En un estudio reciente (Papanastasiou, M. *et al.*, 2017), emplearon espectrometría de masas con intercambio de Hidrógeno-Deuterio (HX-MS) para intentar aclarar esta controversia sobre la conformación de iC3b y conocer con mayor detalle el reajuste que tiene lugar en la región MG-CUB-TED. Mediante esta técnica exploraron la dinámica y los movimientos estructurales de proteínas en solución y pudieron comprobar que el comportamiento de C3b e iC3b mediante esta técnica era similar en su mayor parte, si bien, identificaron áreas con mayor actividad para iC3b en los dominios MG1 y MG2 de la cadena β y del TED. Y sobre todo la mayor diferencia entre C3b e iC3b se detectó en el dominio CUB, donde encontraron un CUB desordenado en iC3b (**Fig. 5.3**).

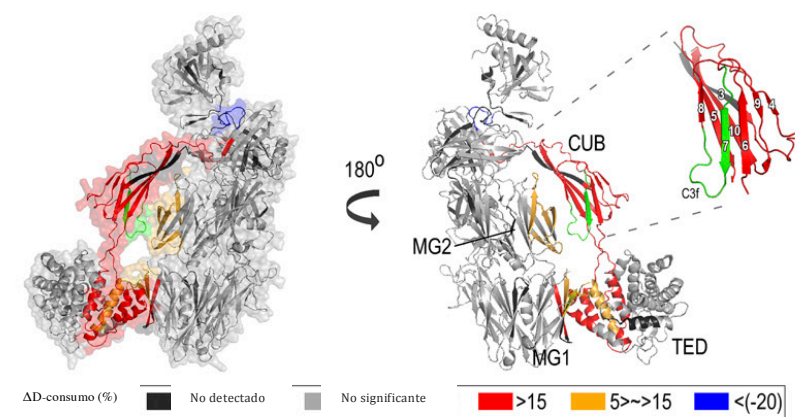


Fig. 5.3 Mapa de diferencia en HX entre C3b e iC3b sobre la estructura de C3b. Péptidos con un consumo en Deuterio (ΔD -consumo) $>5\%$ se mapean en C3b (código PDB **2I07**) (Janssen, *et al.*, 2006). Las regiones más expuestas en iC3b en comparación con C3b frente al intercambio de deuterio se muestran coloreadas en rojo, y las menos expuestas en azul. Los péptidos localizados en el CUB muestran las diferencias más evidentes en el intercambio de deuterio. En resumen, iC3b muestra una conformación más dinámica y más expuesta al solvente. Adaptado de (Papanastasiou M, *et al.*, 2017).

La primera consecuencia de este reajuste conformacional de C3b a iC3b es la disrupción del sitio de unión de fB a C3b, que provoca que iC3b no sea capaz de ensamblarse en la convertasa de C3 de la AP. Ya se ha demostrado previamente que iC3b no interacciona con fB; por lo tanto, no puede conformar una convertasa de C3. Estas ideas fueron revalidadas (Roumenina LT, *et al.*, 2009) mediante experimentos que

demuestran que iC3b puede ensamblar una convertasa de C3 activa con un fB mutante (D279G) asociado a patología, y cuya característica principal es que presenta una mayor afinidad por C3b. Estos datos incrementan la posibilidad de que los sitios de unión por fB en C3b no se interrumpen totalmente en iC3b. Por ello, se diseñaron experimentos para tratar de replicar estos datos de fB mutante con preparaciones de C3b e iC3b purificadas en el laboratorio. Este resultado lo pudimos ilustrar en este estudio mediante resonancia de plasmón superficial (SPR; *Biacore*), mostrando una unión casi imperceptible de fB a iC3b (**Materiales y Métodos** y **Fig. 5.4**), y la incapacidad de fD para cortar fB en presencia de iC3b (**Materiales y Métodos** y **Fig. 5.5**).

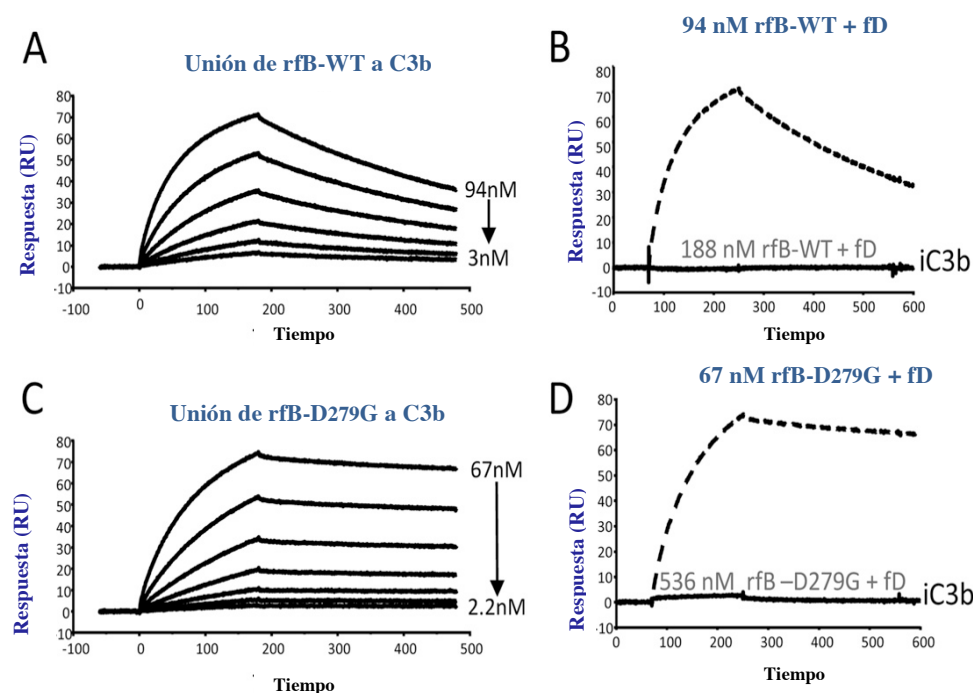


Fig. 5.4 fB no forma convertasa con iC3b. Experimentos de SPR donde, C3b (**A** y **C**, 510 RU) e iC3b (**B** y **D**, 501 RU) fueron inmovilizados en la superficie del chip y, además, fB recombinante (rFB)-WT (**A** y **B**) ó bien rFB-D279G (**C** y **D**) se fluyeron a varias concentraciones en presencia de Mg^{2+} y fD [en Hepes 10 mM (pH 7,4) y NaCl 100 mM]. La convertasa se formó de manera eficiente con C3b. En cambio, rFB-WT no forma convertasa con iC3b (**B**), y se aprecia una mínima unión de rFB-D279G a iC3b, solo detectada a muy altas concentraciones (**D**). Las líneas negras discontinuas en **C** y **D** indican unión de rFB-WT o rFB-D279G a C3b.

El dominio C345c en C3b se une a fB por el dominio factor von Willebrand tipo A (VWA) y un gran cambio conformacional posterior en fB se estabiliza por interacciones

entre el dominio serín-proteasa en fB y los dominios CUB y MG2 en C3b (Gros P, *et al.*, 2008), (Rodríguez de Córdoba S, *et al.*, 2011), (Forneris F, *et al.*, 2010), (Janssen BJ, *et al.*, 2009), (Rooijackers SH, *et al.*, 2009), (Torreira E, *et al.*, 2009), (Wiesmann C, *et al.*, 2006), (Janssen BJ, *et al.*, 2006), (Torreira E, *et al.*, 2009), (Wu J, *et al.*, 2009). El análisis asociado a patología del fB mutante (D279G) que muestra una mayor interacción entre los dominios VWA y el C345c no se adapta bien a la hora de mostrar unión a C3b y generar la convertasa de C3 (Goicoechea de Jorge E, *et al.*, 2007) (**Materiales y Métodos** y **Fig. 5.4** y **Fig. 5.5**). Luego, estos datos indican que la posición del dominio CUB en iC3b no consiguen estabilizar la unión de fB, y no permite su activación.

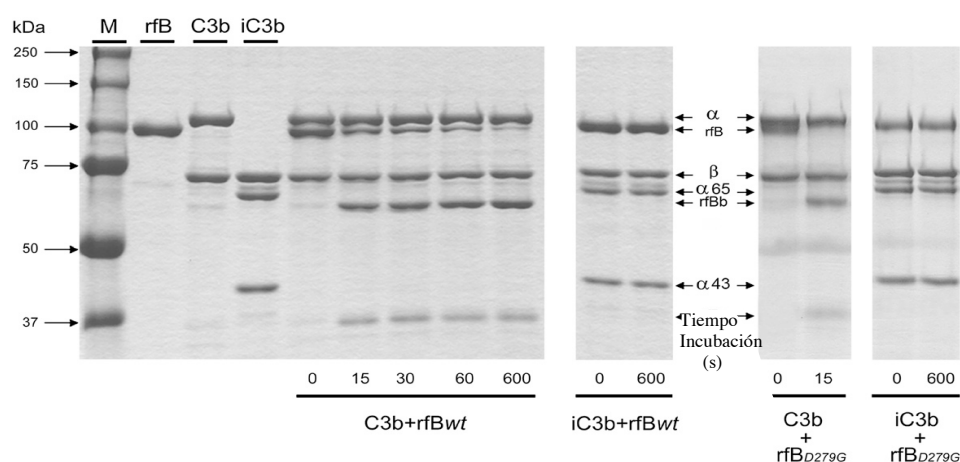


Fig. 5.5 iC3b no induce corte de fB en presencia de fD. Para determinar si la unión de iC3b podría resultar en la activación de fB se incubó iC3b con fB recombinante tipo-salvaje y rfB-D279G en presencia de fD a 37 °C. rfB, fB recombinante; *wt*, tipo salvaje. Se muestra el tiempo de corte proteolítico de rfB y rfB-D279G en presencia de C3b ó iC3b (ambos a 462 μ M), después de añadir la proteasa fD. Las proteínas fueron incubadas a los tiempos indicados, y las muestras fueron analizadas utilizando PAGE al 10%. El corte de fB fue seguido mediante la aparición de los productos de digestión de Ba y Bb. La dificultad para obtener la evidencia de que iC3b interaccionaba con fB y/o causaba su proteólisis por fD es, consistente con datos previos, y con los datos estructurales de iC3b presentados en este trabajo. Nuestra conclusión es que el sitio de unión de fB a C3b está bloqueado en iC3b, reduciendo ampliamente la afinidad global entre fB e iC3b y previniendo la formación de la convertasa de C3 de la AP con iC3b.

5.1.3 Consecuencias de la conformación de iC3b en la unión a fB

El bloqueo en la unión de fB a iC3b permite que se generen sitios de unión para CR3 y CR4. Estos CRs son integrinas de la subfamilia β_2 que contienen un dominio VWA involucrado en el reconocimiento de iC3b (Chen X, *et al.*, 2010), (Ustinov VA, *et al.*, 2005). El dominio C345c en iC3b podría ser capaz de reconocer dominios VWA de una manera dependiente de ion; luego, proponemos que la unión de CR3 y CR4 a iC3b es similar a la interacción entre fB y C3b e involucra el dominio C345c en iC3b. En suma, el reajuste del dominio TED en la proximidad del dominio C345c podría contribuir a generar los requerimientos estructurales para unirse a CR3 y CR4. Esta hipótesis se refuerza con la idea de que C3d habría mostrado una débil unión a CR3 (Gaither TA, *et al.*, 1987), sugiriendo que el dominio TED en iC3b contribuye a la interacción con CR3. Además, estudios de mutaciones han mostrado que el N-ter de la cadena α' , que se encuentra próximo a la región ocupada por los dominios C345c, CUB y TED en iC3b, está involucrada en la interacción con CR3 (Taniguchi-Sidle A, *et al.*, 1994). CRiG interacciona con C3b e iC3b (Wiesmann C, *et al.*, 2006). Nuestro modelo es compatible con la idea de que el sitio de unión de CRiG se mantenga accesible tras el corte de C3b a iC3b (Fig. 5.6).

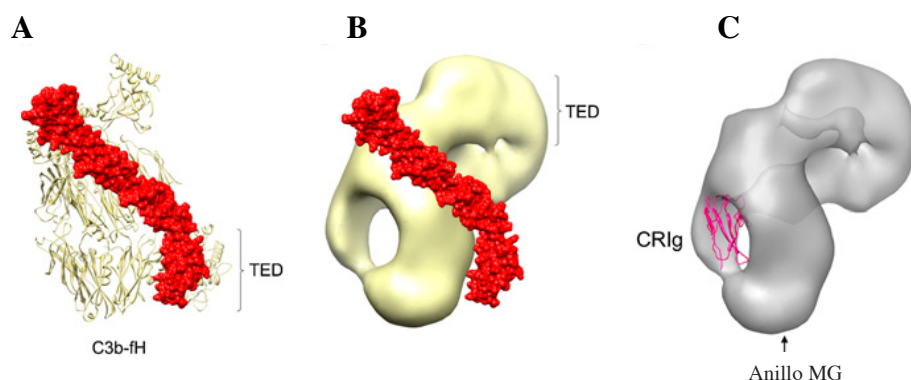


Fig. 5.6 La conformación de iC3b es compatible con la unión de CRiG e incompatible con la unión de fH. (A) Estructura atómica del complejo C3b:fH (SCR1-4) (1). fH se muestra como una superficie y coloreado en rojo. C3b se muestra como cintas amarillas (B) Estructura 3D-EM de iC3b, donde la estructura atómica de fH fue superpuesta tal y como se encuentra en el complejo C3b:fH(SCR1-4) (1). Este modelo fue obtenido alineando los anillos MG de C3b en el complejo C3b:fH(SCR1-4) (Wu J, *et al.*, 2009) y el anillo MG de la estructura EM de iC3b. El movimiento del dominio TED en iC3b interrumpe algunos de los sitios de interacción de fH en C3b. (C) Modelo de la interacción de iC3b con CRiG. La estructura del complejo entre C3b y CRiG (código PDB ID 2ICF) (Wiesmann C, *et al.*, 2006) fue alineado con iC3b utilizando el anillo MG como referencia para el alineamiento.

Los reguladores del complemento fH, MCP y CR1 están genética y estructuralmente relacionados, y además formados por un conjunto de repeticiones cortas consenso (SCRs). SCR4 en fH reconoce el dominio TED en C3b (Wu J, *et al.*, 2009). Basándonos en la estructura de MCP (Persson BD, *et al.*, 2010), especulamos que el SCR4 de MCP podría unirse de manera similar al dominio TED de C3b, y, además, que este modo de reconocimiento podría también ser válido para CR1.

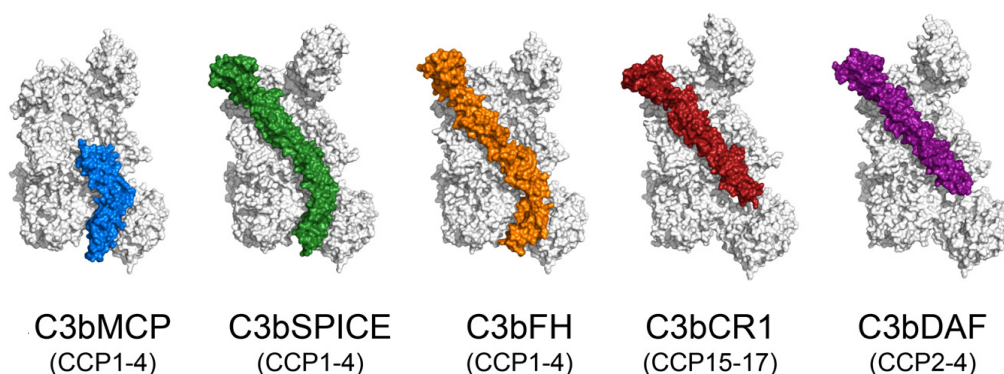


Fig. 5.7 Visión estructural de complejos que regulan a C3b. De izquierda a derecha, representación superficial de la estructura 3D de C3b con los diferentes reguladores. (Azul) C3b-MCP (CCP1-4), (verde) C3b-SPICE (CCP1-4), (naranja) C3b:fH (CCP1-4), (rojo oscuro) C3bCR1 (CCP15-17), (violeta) C3b-DAF (CCP2-4). Imagen adaptada de Forneris, (Forneris F, *et al.*, 2016)

Por lo tanto, la recolocación de este dominio durante la transformación de C3b a iC3b podría prevenir su interacción con fH y MCP (**Fig. 5.6**), como trabajos previos han mostrado antes y como además se ha corroborado en un trabajo reciente (Forneris F, *et al.*, 2016) (**Fig. 5.7**), donde este origen evolutivo común para los mecanismos inhibidores, que presentan una unión variable a C3b a través de sitios ligeramente diferentes, generan una herramienta para comprender mejor la evasión inmune y mutaciones relativas a desordenes en la activación de los reguladores del complemento (del inglés, *RCA*). De manera similar, no detectamos unión entre iC3b y MCP, e iC3b y fH utilizando SPR (**Materiales y Métodos**). Y no hay corte de iC3b por fH en presencia de MCP y fH (**Materiales y Métodos** y **Fig. 5.8**).

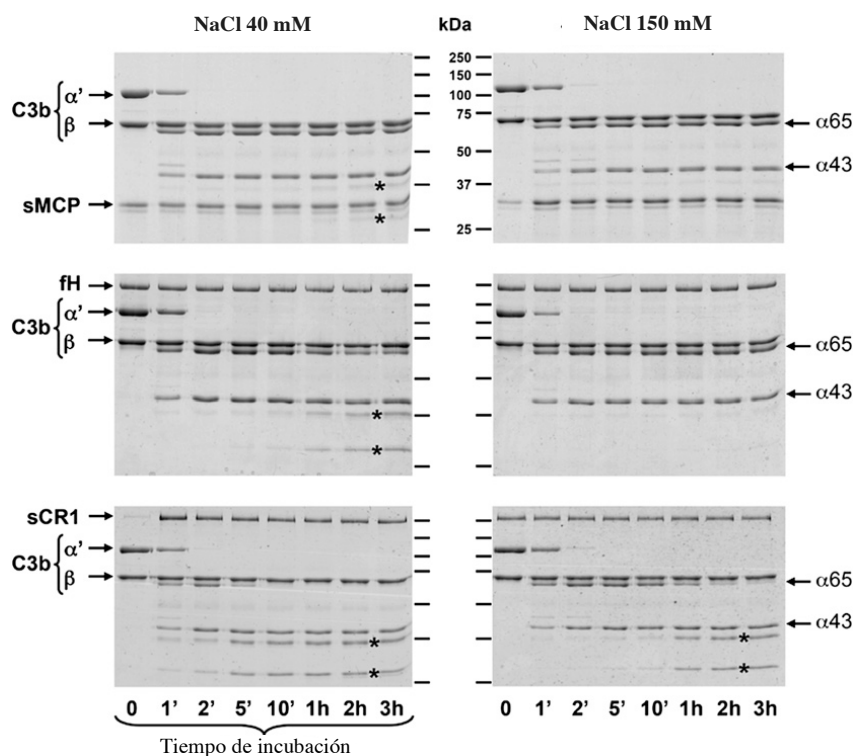


Fig. 5.8 La conformación de iC3b influye en el corte de fI en presencia de cofactores fH, sMCP, y sCR1. El corte de C3b por fI en presencia de sMCP (*Arriba*), fH (*Medio*) ó sCR1 (*Abajo*) utilizando condiciones de baja fuerza iónica (40 mM NaCl) y fuerza iónica fisiológica (150 mM NaCl). Los productos que resultan del corte de la cadena $\alpha 65$ de iC3b han sido marcados con asterisco. En consonancia con datos históricos previos, la adición de cada uno de los tres reguladores resulta en un corte muy rápido de C3b a iC3b mediante fI, indicando que la estructura de C3b permite una unión eficiente de los reguladores fH, sMCP, CR1 y seguidamente, fI. En contraste, el corte de iC3b en C3dg y C3c en presencia de sCR1 es un corte lento y dependiente de fuerza iónica. Es importante destacar, claramente para fH y mínimamente para sMCP, iC3b es capaz de inducir algún corte mediante fI en condiciones de baja sal (NaCl 40 mM).

Bajo condiciones fisiológicas, CR1 es el único regulador del complemento que se ha descrito para mediar el corte de iC3b, dependiente de fI (Lambris JD, *et al.*, 1996), (Ross GD, *et al.*, 1982). Es interesante destacar que la interacción entre CR1 y C3b se encuentra fuertemente afectada tras los reajustes en iC3b, indicando que la posición del dominio TED en iC3b interfiere parcialmente con la unión de CR1 (**Materiales y Métodos, Fig. 5.7 y Fig. 5.8**). Una afinidad más alta de CR1 por iC3b comparada con fH o MCP podría ser crítica para CR1 para actuar como cofactor para fI. Esto podría

permitir a CR1 mantenerse unido a iC3b después del primer corte de C3b, manteniendo iC3b en una conformación susceptible de ser cortada por fI.

	fB	fH	MCP	CR1g	CR2, CR3, CR4	CR1
C3b	✓	✓	✓	✓	✗	✗
iC3b	✗	✗	✗	✓	✓	✓

Tabla 5.1 Resumen y comparativa de unión entre reguladores de la vía alternativa del complemento, y C3b e iC3b. C3b se une a fB, fH, MCP, pero no lo hace iC3b. iC3b presenta unión para los reguladores del complemento CR, pero no C3b. CR1g es el único de los reguladores que presenta unión a C3b e iC3b.

5.2 Anticuerpos dirigidos frente a fragmentos de C3

5.2.1 A partir del trabajo con mAbs

La activación de la vía alternativa (AP) se inicia por el corte de C3 a C3b, resultando en la exposición de superficies que son inaccesibles en C3, y mostrando otras nuevas que puede favorecer la unión de proteínas que activan y regulan la respuesta del complemento. Tras la activación de C3, esta proteína genera varios fragmentos e intermedios a través de varios estados conformacionales. Las conformaciones específicas y superficies expuestas para cada uno de estos fragmentos están en el núcleo de cómo el complemento se activa y se regula. Tomando estos principios trabajamos en la hipótesis por la cual se podría diseñar una estrategia para generar mAbs cuya superficie fuese diana y se mostrase expuesta específicamente en alguno de estos intermedios estructurales. Estos mAbs podrían servir como reactivos útiles frente a mecanismos funcionales no descubiertos, y además tener interés en investigación y/o intervenir en desordenes específicos del complemento en humanos.

En esta tesis, y junto al grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba, empleamos una estrategia de cribado para identificar cuatro anticuerpos monoclonales mAbs con diana frente a diferentes regiones en varios fragmentos de C3. Los mAbs fueron

seleccionados y caracterizados utilizando para ello una batería de ensayos bioquímicos, de hemólisis, estructurales y SPR, y el resumen de todas sus características pueden encontrarse en la **Tabla 5.2**. Se produjeron tres mAbs (C3-12.17, C3-16.4 y C3-42.3) que señalizan varias regiones del anillo MG, y un mAb (C3-12.2) que reconoce un epítipo que se encuentra presente en C3dg. C3-12.2 une iC3b, C3dg y C3d, pero no C3b, que reconoce una región en C3d que solo es expuesta tras el corte de C3b a iC3b. C3-12.2 se une a C3dg de varias especies (humano, ratón y rata), y puesto que no existe mucha variedad de buenos anticuerpos frente a C3d, hace que sea un reactivo muy interesante.

C3-12.17 y C3-42.3 bloquean el corte de C3 a C3b, pero no el ensamblaje de la convertasa C3bBb, y por lo tanto estos mAbs proveen un soporte al modelo actual en el reconocimiento de C3 por la convertasa de C3. Se ha propuesto que el reconocimiento de C3 por la convertasa C3Bb tiene lugar mediante la formación de un complejo C3b-C3bBb por medio del anillo de MG. La validez de este modelo se pudo demostrar de manera indirecta. Las estructuras obtenidas a partir del cristal de los complejos de C3b a menudo revelan que C3 y otros fragmentos de C3 tienen una tendencia a interaccionar a través de la parte trasera de los anillos MG. Otra evidencia adicional que encontró el grupo de colaboración fue el de una familia española que portaba una pequeña delección situada en el anillo MG de C3 relacionada con Síndrome Hemolítico-Anémico aHUS. La caracterización genética, bioquímica y estructural de esta delección sugería de una manera evidente que la versión mutada de C3 podría no ser reconocida por la convertasa C3bBb. Nuestros resultados revelan que el bloqueo de la superficie del anillo MG por C3-12.17 y C3-42.3 interfiere con la unión de C3 a la convertasa de C3. Como control utilizamos C3-16.4 que también se une al anillo MG en un sitio diferente pero no afecta al corte de C3 a C3b.

Los mAbs frente a proteínas del complemento han mostrado ser excelentes reactivos para el estudio de la activación del complemento y su regulación. Asimismo, los mAbs han tenido la capacidad para inactivar el complemento como estrategia terapéutica en varias enfermedades. A pesar de estos éxitos, son necesarios nuevos reactivos, especialmente aquellos que reconocen con gran especificidad superficies solo disponibles en un cierto paso durante la activación de C3. En esta tesis mostramos una

estrategia válida generando cuatro anticuerpos de interés con consecuencias funcionales específicas. Estos anticuerpos y otros producidos mediante las mismas estrategias de cribado serán de utilidad para el estudio del complemento. Aquí mostramos como algunos de estos mAbs generan una visión de los mecanismos moleculares de reconocimiento de las moléculas del complemento. Asimismo, este tipo de reactivos podría revelar superficies de potencial interés para modular el complemento utilizándolo como una oportunidad terapéutica más.

5.2.2 Diseñando una estrategia para generar mAbs que señalen superficies relevantes en C3 activado

Se diseñó una estrategia encaminada a encontrar anticuerpos monoclonales (mAbs) que podrían reconocer alguna de las superficies relevantes, presentes en diferentes fragmentos activados de C3. Se seleccionaron cuatro clones (C3-12.17, C3-42.3, C3-16.4 y C3-12.2) que reconocen varios fragmentos de C3 (**Tabla 5.2**). C3-12.17, C3-16.4, y C3-42.3 reconocen C3b, iC3b y C3c. Estos anticuerpos inhiben la lisis de eritrocitos de conejo y además bloquean completamente la opsonización de estos eritrocitos. Por otra parte, C3-12.2 reconoce iC3b, C3dg y C3d. Es importante destacar que los mAbs que inhiben la AP logran una inhibición del 50% a una concentración próxima a equimolar en relación con C3. Gracias a ello, estos mAbs refuerzan la potencial relevancia para emplearlos como agentes terapéuticos.

5.2.3 Bases estructurales de inhibición de la AP por C3-12.17 y C3-42.3

Tras resolver las estructuras 3D mediante ME de los complejos C3b-Fab e iC3b-Fab para los mAbs C3-12.17 y C3-42.3 pudimos explicar cómo podían bloquear la activación de C3 sin afectar al ensamblaje de la convertasa de C3 de la AP, uniéndose a la región de C3 y C3b que ha sido postulada a ser la que está involucrada en el reconocimiento del sustrato (C3) por la C3 convertasa de la AP, C3bBb (Laursen N, *et al.*, 2011), (Martinez-Barricarte R, *et al.*, 2010), (Rooijakkers SH, *et al.*, 2009).

5.2.4 C3-12.17 y C3-42.3 inhibe la AP bloqueando la interacción de C3 con la C3-convertasa de la AP

Para reafirmar estos resultados estructurales mediante ME, se realizaron experimentos en el grupo de colaboración para demostrar que C3-12.17 y C3-42.3 bloqueaban de una manera eficiente la opsonización mediada por la vía AP y la hemólisis de eritrocitos de conejo en presencia de suero humano normal (datos no mostrados). Para determinar a que nivel inhiben estos mAbs la activación de la AP, se diseñaron experimentos *in vitro* utilizando C3, C3b, fB y fD purificadas. En estos experimentos, C3, C3b y una mezcla equimolar de C3 y C3b se incubaron con fB y fD a 37 °C durante 15 min y los fragmentos activados resultantes se analizaron mediante SDS-PAGE bajo condiciones reducidas (**Fig. 5.9**). En ausencia de anticuerpos inhibidores C3 y fB se consumen completamente. Este cambio se ilustra por la desaparición de las bandas de la cadena α de C3 y de la banda de 90 kDa de fB y la generación de la cadena α' y la banda de 60 kDa de Bb (**Fig. 5.9**).

Como era de esperar, en presencia de C3-12.17 y C3-42.3 no hubo activación de C3. A pesar de ello, fB se consumió completamente indicando que estos dos mAbs bloquean la activación de C3, pero no interfieren con la formación de la convertasa de C3 de la AP (**Fig. 5.8**). Luego, en presencia de C3-12.17 y C3-42.3, fB puede unirse a C3b (o C3H₂O) y fD puede cortar con mayor eficacia a fB a los fragmentos Bb y Ba. Nuestra interpretación es que C3-12.17 y C3-42.3 se unen a la misma región (o a dos regiones similares) en C3 y C3b que no afectan en todo caso a la unión con fB, pero obstaculiza la interacción de C3 con la C3-convertasa de la AP, bloqueando el corte de C3. Alternativamente, estos mAbs podrían bloquear la accesibilidad al sitio de corte en C3 por el sitio catalítico de la convertasa de C3 localizado en el fragmento Bb.

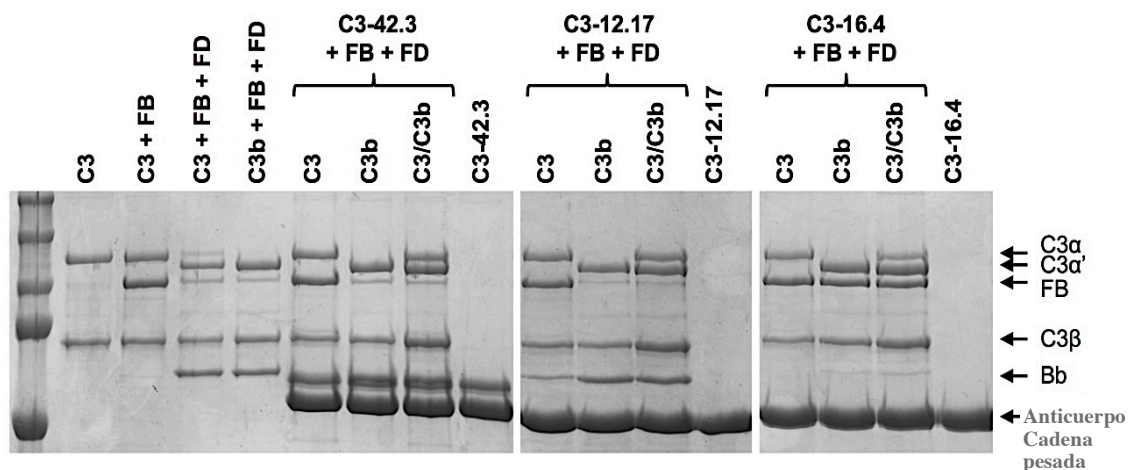


Fig. 5.9 Efectos funcionales de C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 en la activación e inactivación *in vitro* de C3. Las reacciones se analizaron mediante tinción en azul de Coomassie. En presencia de C3-12.17 y C3-42.3 no hay activación de C3, pero fB se consume completamente, indicando que estos dos mAbs bloquean la activación de C3, aunque permiten el ensamblaje de la convertasa de C3. C3-16.4 bloquea la activación de C3b, y fB permanece intacto, sugiriendo que el mAb interfiere con el ensamblaje de la convertasa de C3.

5.2.5 Bases estructurales de la inhibición de la AP mediante C3-16.4

Para mapear el sitio de unión del inmunocomplejo entre C3b y C3-16.4 se resolvió la estructura 3D de los complejos formados entre C3b ó iC3b y el Fab de C3-16.4 (**Fig. 4.2.8**, en Resultados). Estos datos demuestran que el Fab C3-16.4 reconoce una región en torno a MG2 y MG6 y que se sitúa proyectada hacia el frente de la molécula de C3b. La región de C3 mapeada por C3-16.4 es próxima pero no idéntica a la mapeada por otro anticuerpo humanizado que bloquea la unión de fB a C3 y la formación de la convertasa (Pasixao-Cavalcante D, *et al.*, 2014). El Fab de C3-16.4 se sitúa próximo, pero sin llegar a solapar regiones en C3b involucradas en la unión a fB, de acuerdo a la estructura de C3bB (Forneris F, *et al.*, 2016) (PDB 2XWJ). Luego, el efecto de C3-16.4 en la formación de la convertasa podría ser mediante una interacción indirecta. Una posibilidad podría ser que C3-16.4 pudiese alterar la conformación de C3b en características esenciales para la unión de fB.

En el laboratorio con el que colaboramos quisieron además conocer con mayor detalle si la capacidad inhibitoria de C3-16.4 se mantenía en su fragmento Fab o era simplemente una consecuencia de la gran obstrucción estérica causada por la unión de C3b al anticuerpo completo. En esos experimentos demostraron que tanto su fragmento Fab, como el C3-16.4 completo, inhiben de manera eficiente la lisis de eritrocitos de conejo (Datos no mostrados). Además, esto se comprobó utilizando proteínas del complemento purificadas, y también se observó inhibición en la formación de la AP-C3 convertasa, mediante el bloqueo de la activación de fB y C3.

5.2.6 C3-16.4 inhibe la AP previniendo la formación de la C3 convertasa

Si bien C3-12.17 y C3-42.3 tienen la capacidad para inhibir la activación de C3, pero no la formación de la C3-convertasa de la AP, C3-16.4 si bloquea la formación de la C3-convertasa de la AP. Experimentos in vitro incubando de manera conjunta C3, C3b, fB y fD purificadas mostraron que en presencia de C3-16.4 no se consume C3 ni tampoco fB (**Fig. 5.9**). La inhibición del corte de fB a Bb y Ba es particularmente ilustrativa cuando C3b, fB y fD se incuban de manera conjunta, lo cual indica que C3-16.4 bloquea la formación de la C3-convertasa de la AP (**Fig. 5.9**).

La conclusión de estos datos fue que C3-16.4 inhibe la activación de la vía alternativa (AP) bloqueando la interacción de fB con C3b (o C3H₂O) y, por lo tanto, la formación de la convertasa de C3 de la AP.

5.2.7 C3-12.2 reconoce específicamente un nuevo epítipo en iC3b que se encuentra preservado en C3d

Mediante experimentos en fase fluida se observó que C3-12.2 no interfiere en la inactivación de iC3b a C3dg por fI en presencia del receptor del complemento 1 (CR1). Por lo tanto, C3-12.2 demuestra una fuerte unión a iC3b, C3dg y C3d cuando se analiza mediante WB, pero no presenta unión detectable a C3 o C3b cuando se encuentra desnaturalizado mediante SDS. En otro experimento se ilustra que empleando proteína C3dg purificada y plasma activado de humano, rata y ratón en WB, el mAb C3-12.2 reconoce un epítipo evolutivamente conservado en la molécula de C3dg.

Los resultados y la relevancia funcional de cada uno de los mAbs de C3 se muestran en la **Tabla 5.2**.

mAbs	Isotipo	Reconocimiento de fragmento	Reconocimiento de dominio	Relevancia funcional en C3 (vía alternativa)
C3-16.4	IgG1	C3b, iC3b, C3c	MG2, MG6	Bloquea la formación de la convertasa de C3
C3-12.17	IgG2a	C3b, iC3b, C3c	MG3, MG4	Bloquea la activación de C3 mediante la convertasa de C3
C3-42.3	IgG2a	C3b, iC3b, C3c	MG4, MG5	Bloquea la activación de C3 mediante la convertasa de C3
C3-12.2	IgG1	iC3b, C3dg, C3d	CUB-TED	

Tabla 5.2 Caracterización de cuatro mAbs. Mediante WB se definen los fragmentos reconocidos por cada mAb, y la ME se utilizó para mapear el dominio en C3b/iC3b reconocido por el Fab de cada mAb. En la tabla se muestra el reconocimiento de dominio de cada uno de los mAb, así como la relevancia funcional que cada uno de ellos tiene frente a C3 de la vía alternativa (AP).

C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 son, por lo tanto, nuevos mAbs que se pueden incluir dentro de la lista de moléculas con capacidad para bloquear la formación y/o la actividad de la AP-C3-convertasa y que, tras su humanización podría ser empleado para modular la respuesta de la vía alternativa en aquellas enfermedades en las que la activación del complemento contribuye a patología. En el grupo del Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba quisieron profundizar más sobre la utilidad de los mAbs para modular las consecuencias de la activación del complemento en enfermedades caracterizadas por la desregulación del complemento AP, y las emplearon con éxito en un modelo aHUS in vitro con eritrocitos de oveja. Y también se consiguieron resultados en un modelo ex vivo, que utiliza eritrocitos de pacientes con Hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH) tratados con eculizumab, un nuevo mAb humanizado frente a C5 que se está aplicando en inmunoterapia. El tratamiento con eculizumab ha mejorado significativamente la calidad de vida de los pacientes con PNH, una enfermedad rara, crónica, caracterizada por una pérdida de proteínas reguladoras del complemento, y son por lo tanto, pacientes susceptibles de una lisis mediada por el

complemento. Sin embargo, debido a que eculizumab no bloquea la actividad de la convertasa AP C3, la opsonización C3 de los eritrocitos PNH persiste, dando como resultado porcentajes variables de eritrocitos cubiertos por fragmentos C3, que son susceptibles a la hemólisis extracelular (Risitano A, *et al.*, 2009). Utilizando los eritrocitos PNH obtenidos de los pacientes tratados con eculizumab, pudimos demostrar que C3-12.17 y C3-42.3 evitaban eficazmente su lisis en presencia de suero humano acidificado.

La correlación entre la estructura y función que presentan los mAbs C3-12.17, C3-42.3 y C3-16.4 es importante, ya que proporcionan una revalidación adicional a los modelos 3D actualmente aceptados que explican la estructura y el reconocimiento de C3 mediante la convertasa C3bBb. La unión entre dos anillos de MG obtenidos mediante estructuras cristalinas de un complejo dimérico de convertasa (Rooijakkers SH, *et al.*, 2009), y la estructura cristalina del factor de veneno de cobra (CVF) en complejo con C5 (Laursen NS, *et al.*, 2011), se han utilizado sobre la hipótesis de cómo una convertasa reconoce su sustrato, C3. Una mutación próxima al punto de unión propuesto entre la convertasa y C3, bloquea el reconocimiento de sustrato por la convertasa, tal y como el que se presenta en un trabajo previo del grupo de colaboración (Martinez-Barricarte R, *et al.*, 2010).

El análisis estructural y funcional de los mAbs C3-12.17 y C3-42.3 que se ha realizado en este trabajo refuerza aún más este modelo. Ambos anticuerpos se unen al anillo MG en una región que impide la formación de heterodímeros C3-C3b, y como se predice por el modelo actual, ambos mAbs no bloquean la formación de convertasa, pero la disociación C3 a C3b si que se vería afectada.

Por otro lado, C3-16.4 mapea una región adyacente a la reconocida por H17, un anticuerpo humanizado que bloquea la unión de fB a C3b (Paixao-Cavalcante D, *et al.*, 2014). C3-16.4 interfiere con el ensamblaje de una convertasa y el análisis estructural sugiere que estos efectos deben producirse de una manera indirecta, ya que el anticuerpo no se une a una región implicada en la interacción con fB. Una posibilidad podría ser que C3-16.4 modifique la conformación de C3b en regiones que son esenciales para la unión a fB.

Además de los tres anticuerpos que inhiben la activación de AP, se ha mostrado la generación y caracterización de un cuarto mAb, C3-12.2, que reconoce específicamente iC3b, C3dg y C3d, en humanos y otras especies. Este mAb puede utilizarse para tratar estos fragmentos de C3 activados en fase fluida o unidos a tejidos, que confiere a este mAb una importancia diagnóstica y terapéutica.

Los mAbs que reconocen eficientemente iC3b de diferentes especies son escasos y por lo tanto de gran valor, debido a sus potenciales aplicaciones en la investigación básica y clínica. C3-12.2 por ejemplo, se comprobó que era útil para detectar la deposición de iC3b / C3dg humano y de ratón sobre superficies opsonizadas mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica (datos no mostrados), extendiendo el pequeño repertorio de mAb que se pueden usar para monitorizar la activación del complemento (Thurman JM, *et al.*, 2013). Además, C3-12.2 también se ha utilizado con éxito para desarrollar un ELISA específico para medir iC3b y para purificar C3dg de ratón de manera homogénea a partir de suero de ratón activado empleando para ello un solo paso de cromatografía de afinidad (datos no mostrados).

En conclusión, los mAbs dirigidos a las proteínas del complemento son una fuente continua de reactivos valiosos para el desarrollo de herramientas terapéuticas y de diagnóstico. También proporcionan información útil para estudiar las relaciones funcionales y estructurales en la activación y regulación del complemento. A pesar de la existencia de otros mAb anti-complemento, estos existen muchos y aquellos que estén bien caracterizados en sus propiedades funcionales y estructurales se encuentran a día de hoy en un número escaso. En este contexto, estos cuatro nuevos mAbs contra C3 humano, producidos en el laboratorio, junto a los previamente generados por Thurman *et al.*, (Thurman JM, *et al.*, 2013) muestran un repertorio de nuevos reactivos que se unen a regiones funcionales o neo-epítomos únicos en C3, con potencialidades diagnósticas y terapéuticas relevantes.



6 Conclusiones

- 1 En este trabajo presentamos un análisis de la estructura de iC3b mediante microscopía electrónica 3D. Estos datos revelan que los dominios CUB y TED presentan una remarcada movilidad, adoptando diferentes posiciones en las moléculas C3, C3b e iC3b.
- 2 Por el contrario, el anillo MG se presenta como un armazón rígido, soportando el conjunto de reordenaciones, cuando se liberan los diferentes fragmentos de C3, mediante escisión proteolítica.
- 3 El reordenamiento conformacional de C3b a iC3b provoca que iC3b no pueda conformar una convertasa de C3 de la vía alternativa, ni que tampoco pueda reconocer los reguladores del complemento fH y MCP.
- 4 Por otra parte, este reordenamiento genera superficies de unión para que iC3b pueda interactuar con CR2, CR3 y CR4, que median importantes respuestas inmunológicas, potenciando la inmunidad mediada por células B, modulando la inflamación y dirigiendo la eliminación de patógenos mediante fagocitosis.
- 5 Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales (mAbs) se ha podido conocer con mayor detalle cómo el bloqueo mediado por los inmunocomplejos se puede utilizar para comprender mejor los mecanismos de formación de la convertasa de C3.
- 6 Se caracterizaron estructuralmente los sitios de interacción de mAbs frente a los fragmentos de C3, resolviendo las estructuras de los fragmentos Fab unidos a C3b y/o iC3b, mediante microscopía electrónica.
- 7 Mediante su caracterización estructural y funcional se ha podido determinar que tres mAbs interactúan con C3 e inhiben la activación de la AP del complemento. Dos de ellos, C3-12.17 y C3-42.3, bloquean el corte de C3 producido por la convertasa de C3 de la AP. Uno de ellos, C3-16.4 impide la formación de la convertasa de C3 de la AP.

- 8 El cuarto mAb, C3-12.2, reconoce específicamente los fragmentos iC3b, C3dg y C3d, mediante un neoepítipo evolutivamente conservado generado tras el corte de fI sobre C3b.
- 9 Los mAbs dirigidos a las proteínas del complemento son una fuente de reactivos valiosos para el desarrollo de herramientas terapéuticas y diagnósticas. Mediante este trabajo se ha podido profundizar en el conocimiento de las relaciones funcionales y estructurales en la activación y regulación del complemento, proporcionando un nuevo conjunto de reactivos frente a C3, con potencialidades diagnósticas y terapéuticas relevantes.



Bibliografía

- Abbas AH, Lichtman AH, Pober JS. (2000). *Inmunología celular y molecular*.
- Alcorlo M, Martinez-Barricarte R, Fernandez FJ, Rodriguez-Gallego C, Round A, Vega MC, Harris CL, *et al.*, (2011). *Unique structure of iC3b resolved at a resolution of 24 Å by 3D-electron microscopy*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 108: 13236–13240.
- Alcorlo M, *et al.*, (2015). *Structural insights on complement activation*. FEBS J. 282(20): p. 3883-91.
- Baker ML, *et al.*, (2010) *Cryo-EM of macromolecular assemblies at near-atomic resolution*. Nat Protoc. 5(10): p. 1697-708.
- Chen X, *et al.*, (2010). *Requirement of open headpiece conformation for activation of leukocyte integrin $\alpha X\beta 2$* . Proc Natl Acad Sci U.S.A 107: 14727-14732.
- Chen X, *et al.*, (2012). *Molecular basis for complement recognition by integrin $\alpha X\beta 2$* . Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012. 109: 4586–4591.
- Cong Y, Baker ML, Jakana J, Woolford D, Miller EJ, Reissmann S, Kumar RN, Redding-Johanson AM, Batth TS, Mukhopadhyay A, Ludtke SJ, Frydman J, Chiu W. (2010) *4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. Mar 16;107(11):4967-72.
- Crowther R.A, DeRosier DJ, Klug A. (1970). *The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy*. Proc. R. Soc. Lond 317, 319-340.
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. (1988). *Cryo-electron microscopy of vitrified specimens*. Quarterly reviews of biophysics 21: 129-228.
- Ehlers MR, (2000). *CR3: A general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity*. Microbes Infect 2: 289-294.
- Fernandez-Leiro R, Scheres SHW. (2016). *Unravelling biological macromolecules with cryo-electron microscopy*. Nature. 537:339–346. doi: 10.1038/nature19948.
- Frank J. (1996) *Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies*. Academic Press. Ltd, London, UK.

- Forneris F, Ricklin D, Wu J, Tzekou A, Wallace RS, Lambris JD and Gros P. (2010). *Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation*. Science 330: 1816-1820.
- Forneris F, Wu J, Xue X, Ricklin D, Lin Z, Sfyroera G, Tzekou A, Volokhina E, Granneman JC, Hauhart R, Bertram P, Liszewski MK, Atkinson JP, Lambris JD, Gros P. (2016). *Regulators of complement activity mediate inhibitory mechanisms through a common C3b-binding mode*. EMBO 35(10):1133-49.
- Gaither TA, Vargas I, Inada S, Frank MM. (1987). *The complement fragment C3b facilitates phagocytosis by monocytes*. Immunology 62: 405-411.
- Goddard TD, Huang CC, Ferrin TE. (2007). *Visualizing density maps with UCSF Chimera*. J Struct Biol 157: 281-287.
- Goicoechea de Jorge E, Harris CL, Esparza-Gordillo J, et al., (2007). *Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome*. Proc Natl Acad Sci U.S.A.; 104: 240-245.
- Gros P, Milder FJ, Janssen BJ. (2008). *Complement driven by conformational changes*. Nat Rev Immunol; 8: 48-58.
- Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A. (1997). *Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody*. Biochemistry. Feb 18;36(7):1581-97.
- Helmy KY, et al., (2006). *CRlg: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens*. Cell 124: 915-927.
- Heymann JB, and Belnap DM. (2007) *Bsoft: image processing and molecular modelling for electron microscopy*. J. Struct. Bios. 157:3-18.
- Isenman DE. (1983) *Conformational changes accompanying proteolytic cleavage of human complement protein C3b by the regulatory enzyme factor I and its cofactor H*. Spectroscopic and enzymological studies. J Biol Chem 258:4238-4244.
- Janssen BJ, et al., (2005). *Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity*. Nature 437: 505-511.
- Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, and Gros P. (2006). *Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity*. Nature 444: 213-216.

- Jiang W, Baker ML, Ludtke SJ, Chiu W. (2001). *Bridging the information gap: computational tools for intermediate resolution structure interpretation*. J Mol Biol. May 18;308(5):1033-44.
- Kangas JA, Kohonen TK, Laaksonen JT. (1990) *Variants of self-organizing maps*. IEEE Trans Neural Netw. 1(1):93-9.
- Kohonen T. (1990) *Cortical maps*. Nature. Jul 5;346(6279):24.
- Laemmli UK. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. Aug 15;227(5259):680-5.
- Lambris JD, Lao Z, Oglesby TJ, Atkinson JP, Hack CE, Becherer JD. (1996) *Dissection of CRI, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component*. J Immunol. Jun 15;156(12):4821-32.
- Lander GC, Saibil HR, Nogales E. (2012) *Go hybrid: EM, crystallography, and beyond*. Curr Opin Struct Biol. Oct;22(5):627-35. doi: 10.1016/j.sbi.2012.07.006
- Lea SM, Johnson S. (2012) *Putting the structure into complement*. Immunobiology 217, 1117–1121.
- Lorca O. (2005) *Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy*. Acta Pharmacol Sin. 26 (10): p. 1153-64
- Ludtke SJ, Baldwin PR, and Chiu W. (1990) *EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions*. J Struct Biol. 128 (1): p. 82-97
- Ludtke SJ, Jakana J, Song JL, Chuang DT, Chiu W. (2001) *A 11.5 Å single particle reconstruction of GroEL using EMAN*. J Mol Biol. Nov 23;314(2):253-62.
- Ludtke SJ. (2010) *3-D structures of macromolecules using single-particle analysis in EMAN*. Methods Mol Biol 673:157–173.
- Marabini R, Masegosa IM, San Martín MC, Marco S, Fernandez JJ, de la Fraga LG, Vaquerizo C, and Carazo JM. (1996). *Xmipp: An Image Processing Package for Electron Microscopy*. J Struct Bion. 116,237-240.
- Martinez-Barricarte R, et al., (2010) *Human C mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation*. J Clin Invest.120(10): p.3702-12.

- Matsumoto AK, *et al.*, (1991). *Intersection of the complement and immune systems: A signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19*. J Exp Med 173: 55-64.
- Merk A, *et al.*, (2016) Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. Cell 165, 1698–1707.
- Milazzo AC, Leblanc P, Duttweiler F, Jin L, Bouwer JC, Peltier S, Ellisman M, Bieser F, Matis HS, Wieman H, Denes P, Kleinfelder S, Xuong NH. (2005). *Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy*. Ultramicroscopy. Sep;104(2):152-9
- Milder FJ, Gomes L, Schouten A, *et al.* (2007). *Factor B structure provides insights into activation of the central protease of the complement system*. Nat Struct Mol Biol; 14: 224-228.
- Mindell, JA, and Grigorieff N. (2003). *Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy*. J. Struct. Biol. 142: 34-347.
- Muller-Eberhard HJ. (1985). *The killer molecule of complement*. J Invest Dermatol. **85**: 47s-52s
- Muller-Eberhard HJ. (1988). *Molecular organization and function of the complement system*. Annu Rev Biochem; 57: 321-347.
- Nishida N, Walz T, and Springer TA. (2006). *Structural transitions of complement component C3 and its activation products*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 103 (52): p. 19737-42.
- Ohi M, Li Y, Chen Y, Walz T. (2004). *Negative Staining and Image Classification-Powerful Tools in Modern Electron Microscopy*. Biological procedures online 6: 338-345.
- Orlova EV, and Saibil HR. (2011). *Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy*. Chem Rev. 111(12): p. 7710-48.
- Paixao-Cavalcante D, Torreira E, Lindorfer MA, Rodriguez de Cordoba S, Morgan BP, Taylor RP, Llorca O. and Harris C L (2014). *A humanized antibody that regulates the alternative pathway convertase: potential for therapy of renal disease associated with nephritic factors*. J Immunol 192: 4844-4851.
- Pangburn MK, Muller-Eberhard HJ. (1986). *The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Encymic properties of the bimolecular proteinase*. Biochem J. 235: 723-730.

- Papanastasiou M., *et al.*, (2017). *Structural Implications for the Formation and Function of the Complement Effector Protein iC3b*. J Immunol,
- Persson BB, *et al.*, (2010). *Structure of the extracellular portion of CD46 provides insights into its interactions with complement proteins and pathogens*. PLoS Pathog. 6(9): p. e1001122.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. (2004). *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem. Oct;25(13):1605-12.
- Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J. (1987). *Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of Escherichia coli*. J Microsc 146: 113-136.
- Radon J. (1917). *Ueber die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte laengs gewisser Mannigfaltigkeiten. Berichte ueber die verhandlungen der Koeniglich Saechsichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Leipzig*. Math. Phys., Klasse 69, 262-277.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, *et al.* (2010). *Complement: a key system immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol. 11: 785-797.
- Rodriguez de Cordoba S, Harris CL, Morgan BP, and Llorca O. (2011) *Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway*. Biochim Biophys Acta 1812, 12–22.
- Rooijakkers SH, *et al.*, (2009). *Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor*. Nat Immunol. 10(7): p. 721-7.
- Ross GD. (2000). *Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein*. Crit Rev Immunol 20: 197-222.
- Roumenina LT, Jablonski M, Hue C, *et al.*, (2009). *Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome*. Blood. 114: 2837-2845.
- Scheres S.H, Valle M, Nuñez R, Sorzao CO, Marabini R, Herman GT, Carazo JM (2005.a). *Maximum-likelihood multi-reference refinement for electron microscopy images*. J. Mol.Biol., 348, 1: 139-49.
- Scheres SH, Valle M, Carazo JM (2005.b). *Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images*. Bioinformatics, 21 Suppl 2: ii243-4.

- Scheres SH, *et al.*, (2007) *Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization*. Nat Methods 4:27–29.
- Scheres SH, Nunez-Ramirez R, Sorzano CO, Carazo JM, Marabini R. (2008). *Image processing for electron microscopy single-particle analysis using XMIPP*. Nature protocols 3: 977-990.
- Sorzano CO, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SH, Carazo JM, and Pascual-Montano A. (2004). *XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy*. J Struct Biol, 148, 192-204.
- Sorzano CO, Recarte E, Alcorlo M, Bilbao-Castro JR, San-Martín C, Marabini R, Carazo JM. (2009) *Automatic particle selection from electron micrographs using machine learning techniques*. J Struct Biol. Sep;167(3):252-60.
- Sorzano CO, Bilbao-Castro JR, Shkolnisky Y, Alcorlo M, Melero R, Caffarena-Fernández G, Li M, Xu G, Marabini R, Carazo JM. (2010). *A clustering approach to multireference alignment of single-particle projections in electron microscopy* J Struct Biol. Aug;171(2):197-206.
- Stahlberg H, Walz T. (2008). *Molecular electron microscopy: state of the art and current challenges*. ACS Chem Biol. May 16;3(5):268-81.
- Tang G, Peng L, Baldwin PR, Mann DS, Jiang W, Rees I, Ludtke SJ (2007). *EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy*. J Struct Bios 157: 38-46.
- Taniguchi-Sidle A, Isenman DE. (1994). *Interactions of human complement component C3 with factor B and with complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 3 (CR3. CD11b/CD18) involve an acidic sequence at the N-terminus of C3 alpha'-chain*. J Immunol. 153: 5285-5302.
- Torreira E, *et al.*, (2009). *3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 106(3): 882-887.
- Torreira E, *et al.*, (2009). *Coexistence of closed and open conformations of complement factor B in the alternative pathway C3bB (Mg²⁺) proconvertase*. J Immunol. 183(11): 7347-7351.
- Weis JJ, Tedder TF, Fearon DT. (1984). *Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 81: 881-885.

- Wiesmann C, *et al.*, (2006) *Structure of C3b in complex with CRIg gives insights into regulation of complement activation*. Nature 444:217–220.
- Wriggers W, Birmanns S. (2001). *Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data*. J Struct Biol 133: 193-202.
- Wu J, *et al.*, (2009). *Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators*. Nat Immunol 10:728–733. 2.
- Yu X, *et al.*, (2008). *3.88Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy*. Nature, 2008. 453:415–9.
- Zhang X, SE, Xu C, *et al.*, (2008). *Near- atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction*. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105: p. 1867–72.

Correction

IMMUNOLOGY

Correction for “Unique structure of iC3b resolved at a resolution of 24 Å by 3D-electron microscopy,” by Martin Alcorlo, Ruben Martínez-Barricarte, Francisco J. Fernández, César Rodríguez-Gallego, Adam Round, M. Cristina Vega, Claire L. Harris, Santiago Rodríguez de Cordoba, and Oscar Llorca, which appeared in issue 32, August 9, 2011, of *Proc Natl Acad Sci USA* (108:13236–13240; first published July 25, 2011; 10.1073/pnas.1106746108).

The authors note that, due to a printer’s error, the affiliation for Adam Round should instead appear as European Molecular Biology Laboratory, 38042 Grenoble, France. The corrected author and affiliation lines appear below. The online version has been corrected.

Martin Alcorlo^a, Ruben Martínez-Barricarte^{a,b}, Francisco J. Fernández^a, César Rodríguez-Gallego^a, Adam Round^c, M. Cristina Vega^a, Claire L. Harris^d, Santiago Rodríguez de Cordoba^{a,b,1}, and Oscar Llorca^{a,1}

^aCentro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040 Madrid, Spain; ^bCentro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras, 28040 Madrid, Spain; ^cEuropean Molecular Biology Laboratory, 38042 Grenoble, France; and ^dDepartment of Infection, Immunity, and Biochemistry, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4X, United Kingdom

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1112875108

Unique structure of iC3b resolved at a resolution of 24 Å by 3D-electron microscopy

Martin Alcorlo^a, Ruben Martínez-Barricarte^{a,b}, Francisco J. Fernández^a, César Rodríguez-Gallego^a, Adam Round^c, M. Cristina Vega^a, Claire L. Harris^d, Santiago Rodríguez de Córdoba^{a,b,1}, and Oscar Llorca^{a,1}

^aCentro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040 Madrid, Spain; ^bCentro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras, 28040 Madrid, Spain; ^cEuropean Molecular Biology Laboratory, 38042 Grenoble, France; and ^dDepartment of Infection, Immunity, and Biochemistry, Cardiff University School of Medicine, Cardiff CF14 4X, United Kingdom

Edited* by Douglas T. Fearon, University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, United Kingdom, and approved June 20, 2011 (received for review April 28, 2011)

Activation of C3, deposition of C3b on the target surface, and subsequent amplification by formation of a C3-cleaving enzyme (C3-convertase; C3bBb) triggers the effector functions of complement that result in inflammation and cell lysis. Concurrently, surface-bound C3b is proteolyzed to iC3b by factor I and appropriate cofactors. iC3b then interacts with the complement receptors (CR) of the Ig superfamily, CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) on leukocytes, down-modulating inflammation, enhancing B cell-mediated immunity, and targeting pathogens for clearance by phagocytosis. Using EM and small-angle X-ray scattering, we now present a medium-resolution structure of iC3b (24 Å). iC3b displays a unique conformation with structural features distinct from any other C3 fragment. The macroglobulin ring in iC3b is similar to that in C3b, whereas the TED (thioester-containing domain) domain and the remnants of the CUB (complement protein subcomponents C1r/C1s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein 1) domain have moved to locations more similar to where they were in native C3. A consequence of this large conformational change is the disruption of the factor B binding site, which renders iC3b unable to assemble a C3-convertase. This structural model also justifies the decreased interaction between iC3b and complement regulators and the recognition of iC3b by the CR of the Ig superfamily, CR2, CR3, and CR4. These data further illustrate the extraordinary conformational versatility of C3 to accommodate a great diversity of functional activities.

Complement is a major component of innate immunity with crucial roles in pathogen and apoptotic cell clearance, immune complex handling, and modulation of adaptive immune responses (1, 2). The complement cascade is triggered by three activation pathways, the classic pathway (CP), the lectin pathway (LP), and the alternative pathway (AP), which converge in the central and most important step of complement activation: the formation of unstable protease complexes, called C3 convertases (C3bBb in the AP and C4b2a in the CP/LP), that cleave C3 to generate the activated fragment, C3b. When C3b is generated, a reactive thioester is exposed which is attacked by hydroxyl group-bearing nucleophiles on adjacent surfaces, resulting in covalent binding of C3b to the surface. Assembly of the AP C3-convertase involves Mg²⁺-dependent binding of factor B (fB) to C3b, forming the labile proenzyme C3bBb; factor D (fD) then cleaves fB to yield the active convertase (C3bBb) (1, 3–6). Convertase-generated C3b forms more C3bBb convertase that cleaves additional C3 molecules and provides exponential amplification to the deposition of C3b molecules on the pathogen surface. C3b clustered around these C3 convertases creates an AP C5-convertase (C3bBbC3b) that cleaves C5. Activation of C5 generates C5a, a potent inflammatory mediator, and C5b, which triggers the formation of the cytolytic membrane attack complex.

The effector functions of complement, inducing inflammation and lysis, contribute to control infection and are clearly an effective first-line defense against microbial intruders. However, because a disproportionate complement response may lead to

organ damage and pathology, complement activation is strictly controlled by a number of soluble or membrane-associated regulatory proteins [factor H (fH), Decay-accelerating Factor (DAF), Membrane cofactor protein (MCP), and complement receptor 1 (CR1)], which dissociate the C3/C5 convertases and function as cofactors for the factor I (fI)-mediated proteolysis of C3b (1, 2). Interestingly, although fI-mediated proteolysis inactivates C3b and helps to preserve complement homeostasis and to protect self-components, the C3b degradation products iC3b and C3dg are also active molecules that interact with specialized receptors on leukocytes and are instrumental in modulating the immune responses and targeting pathogens for clearance by phagocytosis.

Cleavage of C3b by fI takes place first at two closely located sites in the complement protein subcomponents C1r/C1s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein 1 (CUB) domain (Arg1,281-Ser1,282 and Arg1,298-Ser1,299) generating iC3b and C3f, a small fragment of 17 amino acids. The fH, MCP, and CR1 are all cofactors of fI for these cleavages. The fI will then also cleave iC3b between residues Arg932 and Glu933 generating C3c, which is released into solution, and C3dg, which remains bound to the target. This third cleavage is much slower; under physiological conditions, it is only produced when CR1 serves as a cofactor for cleavage of iC3b by fI (1, 7, 8).

CR2 (CD21) binds iC3b and C3dg, enhancing B-cell immunity (9–11). Similarly, CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) recognize iC3b and trigger phagocytosis. CR3 and CR4 also perform functions in leukocyte trafficking and migration, synapse formation, and costimulation (12, 13). Notably, phagocytosis mediated by binding of iC3b to CR3 is accompanied by down-regulation of IL-12 and a lack of oxidative burst in macrophages or by a reduction in the expression of costimulatory molecules and impaired maturation of dendritic cells (12). In addition, C3b and iC3b bind to a recently described CR of the Ig superfamily (CRiG), which also contributes to clearance of pathogens and apoptotic cells. The expression of CRiG is restricted to a subset of tissue resident macrophages (14). Binding of CRiG to C3b also inhibits both AP C3- and C5-convertase activity (15).

Clearly, conversion of C3b into iC3b disrupts domains involved in complement amplification and generates CR-specific binding sites that mediate the many iC3b-mediated immunological re-

Author contributions: S.R.d.C. and O.L. designed research; M.A., R.M.-B., F.J.F., C.R.-G., and C.L.H. performed research; A.R., M.C.V., and O.L. analyzed data; and S.R.d.C. and O.L. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

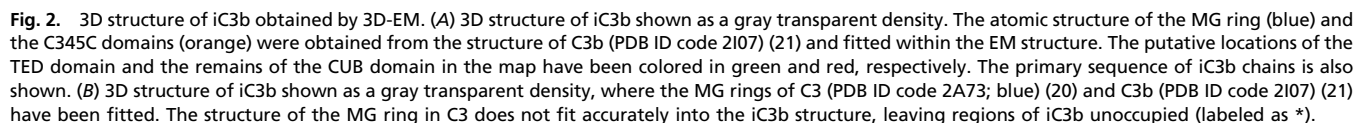
*This Direct Submission article had a prearranged editor.

Data deposition: The 3D-EM map of iC3b has been deposited in the 3D-EM database with accession code [EMD-1908](https://www.ebi.ac.uk/EMD/EMD-1908).

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: srdcordoba@cib.csic.es or llorca@cib.csic.es.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1106746108/-DCSupplemental.

Structure of iC3b in Solution Obtained by SAXS. We performed SAXS experiments to determine the overall shape of the C3, C3b, and iC3b molecules using homogeneously purified samples (Fig. 1A). Model-independent parameters calculated from the SAXS data were coherent with theoretical values calculated from published crystal structures of C3 and C3b (20, 21) and from the iC3b EM structure (this study) (*SI Materials and Methods* and Table S1). The low-resolution SAXS analysis indicated that the three molecules have well-defined structures in solution and display limited conformational flexibility. The size of C3, C3b, and iC3b calculated from SAXS data gave a radius of gyration and longest dimension significantly lower than would be expected for extensively disordered species (*SI Materials and Methods*). The theoretical scattering curves for known crystal structures were calculated and compared with experimental data. The fittings to the experimental data were reasonable even when the structures were considered as one rigid body (*SI Materials and Methods*). Pair distance distribution functions calculated from the SAXS data for C3 and C3b and from the SAXS and EM structures of iC3b (Fig. 3A), as well as the averaged ab initio models constructed for each of the samples (Fig. 3B), provide support for the notion that iC3b displays a conformation significantly closer to C3 than to C3b.



and fH using SPR (*SI Materials and Methods* and Fig. S7) and no cleavage of iC3b by fI in the presence of MCP and fH (*SI Materials and Methods* and Fig. S8).

Under physiological conditions, CR1 is the only complement regulator that has been described to mediate fI-dependent cleavage of iC3b (29, 30). Interestingly, the interaction between CR1 and C3b is also dramatically affected after the rearrangements in iC3b, indicating that the position of the TED domain in iC3b partly interferes with CR1 binding (*SI Materials and Methods* and Figs. S7 and S8). The higher affinity of CR1 for iC3b compared with that of fH or MCP may be critical for CR1 to act as a cofactor of fI. This may allow CR1 to remain bound to iC3b after the first cleavage of C3b, maintaining iC3b in a conformation susceptible to further cleavage by fI.

Concluding Remarks

Here, we have resolved the structure of iC3b, which shows a unique conformation among C3 fragments. Our data reveal that the TED and CUB domains (and the remnants of the CUB domain after proteolysis) present remarkable motility, adopting different positions in the C3, C3b, and iC3b molecules. In contrast, the MG ring appears as a fairly rigid scaffold, supporting the back and forth swinging of these domains as small fragments of C3 are released by proteolytic cleavage (Fig. 4). The conformational rearrangement of C3b into iC3b removes previous surfaces present in C3b that are crucial for the assembly of the AP C3 convertase and for recognition of complement regulators, such as fH and MCP. On the other hand, this rearrangement generates binding surfaces for the interaction with CR2, CR3 and CR4, which mediate important immunological responses, enhancing B cell-mediated immunity, down-modulating inflammation, and targeting pathogens for clearance by phagocytosis.

Materials and Methods

Further details are provided in *SI Materials and Methods*.

Purification of iC3b. iC3b was either purchased from Merck (Calbiochem) or produced from C3 purified from plasma as described previously (31).

Biosensor Analysis/Binding Affinity Assays Using SPR. All analyses were carried out on a Biacore T100 (GE Healthcare). Further details are presented in *SI Materials and Methods*.

EM and 3D Reconstruction of iC3b. C3b preparations were negatively stained with 2% (mass/vol) uranyl formate and visualized in a JEOL 1230 transmission electron microscope. A total of 29,730 images of iC3b were extracted and refined using either an RCT structure or a featureless Gaussian blob as an initial template (Fig. S9). The resolution of the structure was estimated as 24 Å (Fig. S2). The atomic structures of the MG ring from C3 (PDB ID code 2A73) (20) and C3b (PDB ID code 2I07) (21) were fitted within the EM density, showing cross-correlation coefficients >0.8.

SAXS. SAXS data were collected at the BioSAXS station (ID14EH3) at the European Synchrotron Radiation Facility. Further details are presented in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France, for provision of synchrotron radiation facilities at the ID14EH3 beam line. We thank Prof. B. Paul Morgan for useful discussions and Prof. Susan M. Lea for soluble recombinant MCP. This work was funded by Spanish Ministry of Science and Innovation Grant SAF2008-00451 (to O.L.); Grant SAF2008-00226 (to S.R.d.C.); and Grants PET2008_0101, BIO2009-11184, and BFU2010-22260-C02-02 (to M.C.V.). It was also funded by the Fundación Ramón Areces (O.L. and S.R.d.C.) and by Grant G0701298 from the UK Medical Research Council (to C.L.H.). O.L. is additionally supported by the Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer from the Instituto de Salud Carlos III (Grant RD06/0020/1001) and the Human Frontiers Science Program (Grant RGP39/2008). S.R.d.C. is also supported by the Ciber de Enfermedades Raras. M.A. is supported by a Sara Borrell contract from the Instituto de Salud Carlos III (CD09/00282).

- Gros P, Milder FJ, Janssen BJ (2008) Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* 8:48–58.
- Rodríguez de Córdoba S, Harris CL, Morgan BP, Llorca O (2011) Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta* 1812:12–22.
- Forneris F, et al. (2010) Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science* 330:1816–1820.
- Janssen BJ, et al. (2009) Insights into complement convertase formation based on the structure of the factor B-cobra venom factor complex. *EMBO J* 28:2469–2478.
- Rooijackers SH, et al. (2009) Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. *Nat Immunol* 10:721–727.
- Torreira E, Tortajada A, Montes T, Rodríguez de Córdoba S, Llorca O (2009) 3D structure of the C3bB complex provides insights into the activation and regulation of the complement alternative pathway convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:882–887.
- Furtado PB, et al. (2008) The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits access to its C3b and C4b ligands. *J Mol Biol* 375:102–118.
- Smith BO, et al. (2002) Structure of the C3b binding site of CR1 (CD35), the immune adherence receptor. *Cell* 108:769–780.
- Weis JJ, Tedder TF, Fearon DT (1984) Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:881–885.
- van den Elsen JM, Isenman DE (2011) A crystal structure of the complex between human complement receptor 2 and its ligand C3d. *Science* 332:608–611.
- Matsumoto AK, et al. (1991) Intersection of the complement and immune systems: A signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J Exp Med* 173:55–64.
- Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD (2010) Complement: A key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 11:785–797.
- Ross GD (2000) Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/alphaMbeta2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol* 20:197–222.
- Helmy KY, et al. (2006) CRlg: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell* 124:915–927.
- Wiesmann C, et al. (2006) Structure of C3b in complex with CRlg gives insights into regulation of complement activation. *Nature* 444:217–220.
- Isenman DE (1983) Conformational changes accompanying proteolytic cleavage of human complement protein C3b by the regulatory enzyme factor I and its cofactor H. Spectroscopic and enzymological studies. *J Biol Chem* 258:4238–4244.
- Nishida N, Walz T, Springer TA (2006) Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19737–19742.
- Chen X, et al. (2010) Requirement of open headpiece conformation for activation of leukocyte integrin alphaXbeta2. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14727–14732.
- Ehlers MR (2000) CR3: A general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity. *Microbes Infect* 2:289–294.
- Janssen BJ, et al. (2005) Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 437:505–511.
- Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P (2006) Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 444:213–216.
- Torreira E, Tortajada A, Montes T, Rodríguez de Córdoba S, Llorca O (2009) Coexistence of closed and open conformations of complement factor B in the alternative pathway C3bB(Mg2+) proconvertase. *J Immunol* 183:7347–7351.
- Wu J, et al. (2009) Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol* 10:728–733.
- Goicoechea de Jorge E, et al. (2007) Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:240–245.
- Ustinov VA, Plow EF (2005) Identity of the amino acid residues involved in C3bi binding to the I-domain supports a mosaic model to explain the broad ligand repertoire of integrin alpha M beta 2. *Biochemistry* 44:4357–4364.
- Gaither TA, Vargas I, Inada S, Frank MM (1987) The complement fragment C3d facilitates phagocytosis by monocytes. *Immunology* 62:405–411.
- Taniguchi-Sidle A, Isenman DE (1994) Interactions of human complement component C3 with factor B and with complement receptors type 1 (CR1, CD35) and type 3 (CR3, CD11b/CD18) involve an acidic sequence at the N-terminus of C3 alpha'-chain. *J Immunol* 153:5285–5302.
- Persson BD, et al. (2010) Structure of the extracellular portion of CD46 provides insights into its interactions with complement proteins and pathogens. *PLoS Pathog* 6:e1001122.
- Lambris JD, et al. (1996) Dissection of CR1, factor H, membrane cofactor protein, and factor B binding and functional sites in the third complement component. *J Immunol* 156:4821–4832.
- Ross GD, Lambris JD, Cain JA, Newman SL (1982) Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol* 129:2051–2060.
- Martinez-Barricarte R, et al. (2010) Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest* 120:3702–3712.

Supporting Information

Alcorlo et al. 10.1073/pnas.1106746108

SI Materials and Methods

Purification of C3, C3b, iC3b, fH, fI, fB, and sCR1. iC3b was either purchased from Merck (Calbiochem) or produced from C3 purified from plasma as described previously (1). C3 was processed to C3b by adding fB and fD (Calbiochem) in 20 mM Tris, 150 mM NaCl, and 2 mM MgCl₂, followed by incubation for 1 h at 37 °C. The product was loaded into a MonoQ column (GE Healthcare) equilibrated with 20 mM Tris (pH 8.6), and the bound protein was eluted using a gradient to 350 mM NaCl. Fractions containing C3b were pooled and dialyzed against 20 mM Tris, 150 mM NaCl, and 0.02% (vol/vol) Tween-20 (pH 7.6), and they were then incubated at 37 °C for 1 h with soluble recombinant MCP (sMCP; a generous gift from Susan Lea, Oxford University, Oxford, United Kingdom) and fI. This incubation, containing iC3b and the remaining noncleaved C3b, was loaded into a Superose6 column (GE Healthcare) equilibrated with 10 mM Hepes (pH 7.6) and 100 mM NaCl, and the fractions containing iC3b were pooled and stored at –80 °C. fH and fI from human plasma were purified by immunoaffinity chromatography. Briefly, filtered plasma was loaded into an immunoaffinity column coupled to mouse anti-human fH (in-house Ab 214) or fI (Ab MRCox21, a generous gift from Robert Sim from Oxford University, Oxford, United Kingdom) mAbs.

Bound protein was eluted at low pH, and fractions containing the protein were pooled and loaded into a Superose6 column equilibrated with 10 mM Hepes (pH 7.6) and 100 mM NaCl. Recombinant fB (rFB) and D279G-fB (rFB-D279G) were purified from the supernatant of CHO cells as described previously (2). Soluble CR1 (sCR1) was a generous gift from T Cell Sciences.

Fluid Phase Assays. Twenty micrograms of C3b/iC3b was incubated at 37 °C with fH (10 µg), sMCP (6 µg) or sCR1 (6 µg) and fI (1.2 µg) in 20 mM Tris and 40 mM NaCl or 20 mM Tris 15 and 0 mM NaCl. Two micrograms of iC3b were removed from the reaction mix after 0, 1, 2, 5, 10, 60, 120, and 180 min, and the reaction was stopped by adding SDS sample buffer. Samples were analyzed in 10% SDS/PAGE under reducing conditions. Gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad).

Biosensor Analysis/Binding Affinity Assays Using SPR. All analyses were carried out on a Biacore T100 (GE Healthcare). C3b was amine-coupled to a CM5 (carboxymethylated dextran) sensor chip as instructed by the manufacturer (GE Healthcare, NHS/EDC coupling kit). For fH and sMCP kinetics and for convertase formation, 501 relative units (RU) of iC3b and 510 RU of C3b were immobilized. To analyze CR1 binding, 92 RU of C3b or 88 RU of iC3b was immobilized. Data were collected at 25 °C at a flow rate of 30 µL/min and were double-referenced (data from a reference cell and a buffer injection were subtracted) to control for bulk refractive index changes. Analytes were flowed across the C3b surface at different concentrations; in the case of convertase kinetics, fD was included at 1 µg/mL. Convertase formation was analyzed in 10 mM Hepes (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 0.01% SP20, and regulator kinetics were analyzed in 10 mM Hepes (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 0.01% SP20; the surface was regenerated in all cases with 10 mM sodium acetate (pH 4) and 1 M NaCl. Data were evaluated using Biaevaluation T100 evaluation software (version 1.1) (GE Healthcare), and fH, sMCP, and sCR1 kinetics were analyzed by steady-state analysis. Global fitting was used to determine kinetic parameters that fitted all curves (differing concentrations) within an experiment.

EM and 3D Reconstruction of iC3b. iC3b preparations were subjected to a final purification step using size-exclusion Superdex 200 chromatography (GE Healthcare) in 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 150 mM NaCl before the preparation of EM grids. A selected fraction (labeled in Fig. S1) was adsorbed onto glow-discharged carbon-coated grids and negatively stained with 2% (mass/vol) uranyl formate. Grids were visualized in a JEOL 1230 transmission electron microscope operated at 100 kV, and micrographs were recorded under low-dose conditions at a nominal magnification of 50,000 \times . Micrographs were digitalized using a Minolta Dimage Scan Multi PRO scanner.

Untilted (0°) and tilted (47°) micrographs were sequentially taken from a particular area in the grid following an RCT data collection scheme (3). Two thousand pairs of manually extracted particles were used for the RCT reconstruction, performed using XMIPP (4). The RCT reconstruction was low-pass-filtered and used as an ab initio reference model for angular refinement (see below).

For angular refinement, an independent set of micrographs was collected without tilting the specimen holder. Additionally, micrographs were recorded at 47° tilting to increase the number of views obtained for iC3b, and the images extracted were added to the dataset collected without tilting. A total of 29,730 images of iC3b were extracted using EMAN (5) and subjected to 2D reference-free alignment and classification using maximum-likelihood multireference methods (6) as implemented in XMIPP (4). Images were then refined in EMAN (5) using the RCT structure as an initial template. The best 17,178 images of the dataset, as determined by parameters during angular refinement, showed a good angular coverage (Fig. S2C), and these were used to build the final structure. The resolution of the structure was estimated as 24 Å using Fourier shell correlation of two independent reconstructions and a cutoff of 0.5 (Fig. S2D). As a control, we also used a featureless Gaussian blob as a starting template in an independent angular refinement experiment, where there is a minimum bias by the initial reference (Fig. S9). In this case, 7,800 particles from the iC3b sample purified from plasma were manually extracted and refined using EMAN. After a few rounds of refinement, the reconstruction quickly refined to similar structural features as those found for the structure refined from the RCT model (Fig. S9), thus validating the structure obtained.

To investigate the presence of conformational heterogeneity in iC3b, the data were refined using 3D maximum-likelihood classification (7). After convergence of the 3D maximum-likelihood refinement, the dataset was sorted and split into three homogeneous subsets. The three output volumes resembled the average structure of iC3b, indicating that there was no significant conformational heterogeneity of iC3b at the resolution of these studies (Fig. S3).

Fitting of the Atomic Structures into the EM Maps. The atomic structures of the MG ring from C3 (PDB ID code 2A73) (8) and from C3b (PDB ID code 2I07) (9) were fitted within the EM density using SITUS (10), showing cross-correlation coefficients >0.8. TED, C345C, and CUB domains were manually fitted within the EM density, and the fitting was refined using the COLOCOR program from SITUS (10) and University of California, San Francisco (UCSF) Chimera (11). The putative location of the TED and CUB domains in the EM was represented after coloring the corresponding density of the EM map. All EM maps and structures were visualized using UCSF Chimera (11).

SAXS. SAXS data were collected at the BioSAXS station (ID14EH3) at the European Synchrotron Radiation Facility. The wavelength was fixed to $\lambda = 0.931 \text{ \AA}$ (13.32 keV), and the sample-to-detector distance was set to 2.43 m, resulting in a scattering vector, q , ranging from 0.009 to 0.6 \AA^{-1} . The scattering vector is defined as $q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, where 2θ is the scattering angle. All experiments were performed at 5°C . Thirty-five microliters of purified homogeneous protein samples (C3, C3b, and iC3b) were loaded into a 1.8-mm quartz capillary mounted in vacuum, and solution scattering data were measured using an automated robotic sampler that ensures a constant flow of sample through the beam during X-ray exposure to minimize radiation damage. 2D scattering images were collected using a PILATUS 1M detector (Dectris) at a sample-to-detector distance of 2.43 m. A standard data collection time of 5 min, split into ten 30-s exposure frames, was used for all samples. The individual frames were processed automatically by the data collection software BsxCUBE, developed at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), yielding individual radially averaged curves of normalized intensity vs. scattering vector q , which were subsequently averaged for each measurement. Scattered intensity distributions were radially averaged and corrected by subtraction of buffer scattering using PRIMUS (12) from the Atsas program package. Absence of radiation-induced damage was confirmed by manual inspection before merging of the scattering data. A range of C3 (1–5 mg/mL), C3b (1–3 mg/mL), and iC3b (1–5 mg/mL) concentrations was measured, and concentration-dependent interparticle effects were investigated using Guinier plots (13). Normalized curves obtained after minimizing radiation and interparticle effects (with the best signal-to-noise ratio) were then used to determine the model-independent scattering parameters (Table S1) using the pair

distance distribution $P(r)$ functions, calculated by the program GNOM (14): radius of gyration (R_G), estimated molecular mass, particle volume, and maximum dimension (D_{\max}). The R_G was derived by the Guinier approximation $I(q) = I(0) \exp(-q^2 R_G^2/3)$ with the limits $qR_G < 1.6$. The $P(r)$ functions were computed with the program CRY SOL (15) from the SAXS data for C3, C3b, and iC3b and from the EM structure of iC3b. Multiple runs of ab initio modeling performed with DAMMIF (16) were assessed and averaged with DAMAVER (16), and the theoretical scattering for reference C3 (PDB ID code 2A73) (8), C3b (PDB ID code 2I07) (9), and C3c (PDB ID code 2A74) (8) crystal structures or the iC3b EM model was computed for direct cross-comparison with the experimental solution scattering data from C3, C3b, or iC3b and fitted to the merged scattering curves using the program CRY SOL. As expected, each sample's experimental curve fitted its respective crystallographic model best [i.e., with the lowest χ^2 value (C3, $\chi^2 = 3.429$; C3b, $\chi^2 = 2.603$); likewise, the $P(r)$ functions for each molecule showed a distinctive shape and D_{\max} features that enabled meaningful comparisons with the iC3b SAXS and EM structures, for which there is no available atomic model for comparison. We refrained from constructing a hypothetical iC3b model from the available X-ray crystal structures for theoretical scattering calculation to avoid biasing the results and introducing rigid body-fitted chimeric models without appropriate experimental support. The overall shapes were restored from the experimental SAXS data by averaging over multiple runs of the program DAMMIF; the resulting unbiased ab initio models showed a remarkable agreement with the crystal structures of C3 and C3b and, more importantly, corroborated the global shape and structural organization of the iC3b molecule as revealed by EM.

- Martínez-Barricarte R, et al. (2010) Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J Clin Invest* 120:3702–3712.
- Goicoechea de Jorge E, et al. (2007) Gain-of-function mutations in complement factor B are associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:240–245.
- Radermacher M (1988) Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. *J Electron Microscop Tech* 9:359–394.
- Sorzano CO, et al. (2004) XMIPP: A new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol* 148:194–204.
- Ludtke SJ (2010) 3-D structures of macromolecules using single-particle analysis in EMAN. *Methods Mol Biol* 673:157–173.
- Scheres SH, Valle M, Carazo JM (2005) Fast maximum-likelihood refinement of electron microscopy images. *Bioinformatics* 21(Suppl 2):ii243–ii244.
- Scheres SH, et al. (2007) Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat Methods* 4:27–29.
- Janssen BJ, et al. (2005) Structures of complement component C3 provide insights into the function and evolution of immunity. *Nature* 437:505–511.
- Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD, Gros P (2006) Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 444:213–216.
- Wriggers W, Birmanns S (2001) Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J Struct Biol* 133:193–202.
- Goddard TD, Huang CC, Ferrin TE (2007) Visualizing density maps with UCSF Chimera. *J Struct Biol* 157:281–287.
- Konarev PV, Volkov VV, Sokolova AV, Koch MHJ, Svergun DI (2003) PRIMUS: A Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 36:1277–1282.
- Guinier A, Fournet F (1955) *Small Angle Scattering of X-Rays* (Wiley Interscience, New York).
- Svergun DI (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *J Appl Crystallogr* 25:495–503.
- Svergun DI, Barberato C, Koch MHJ (1995) CRY SOL—A program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr* 28:768–773.
- Franke D, Svergun DI (2009) DAMMIF, a program for rapid ab initio shape determination in small angle scattering. *J Appl Crystallogr* 42:342–346.

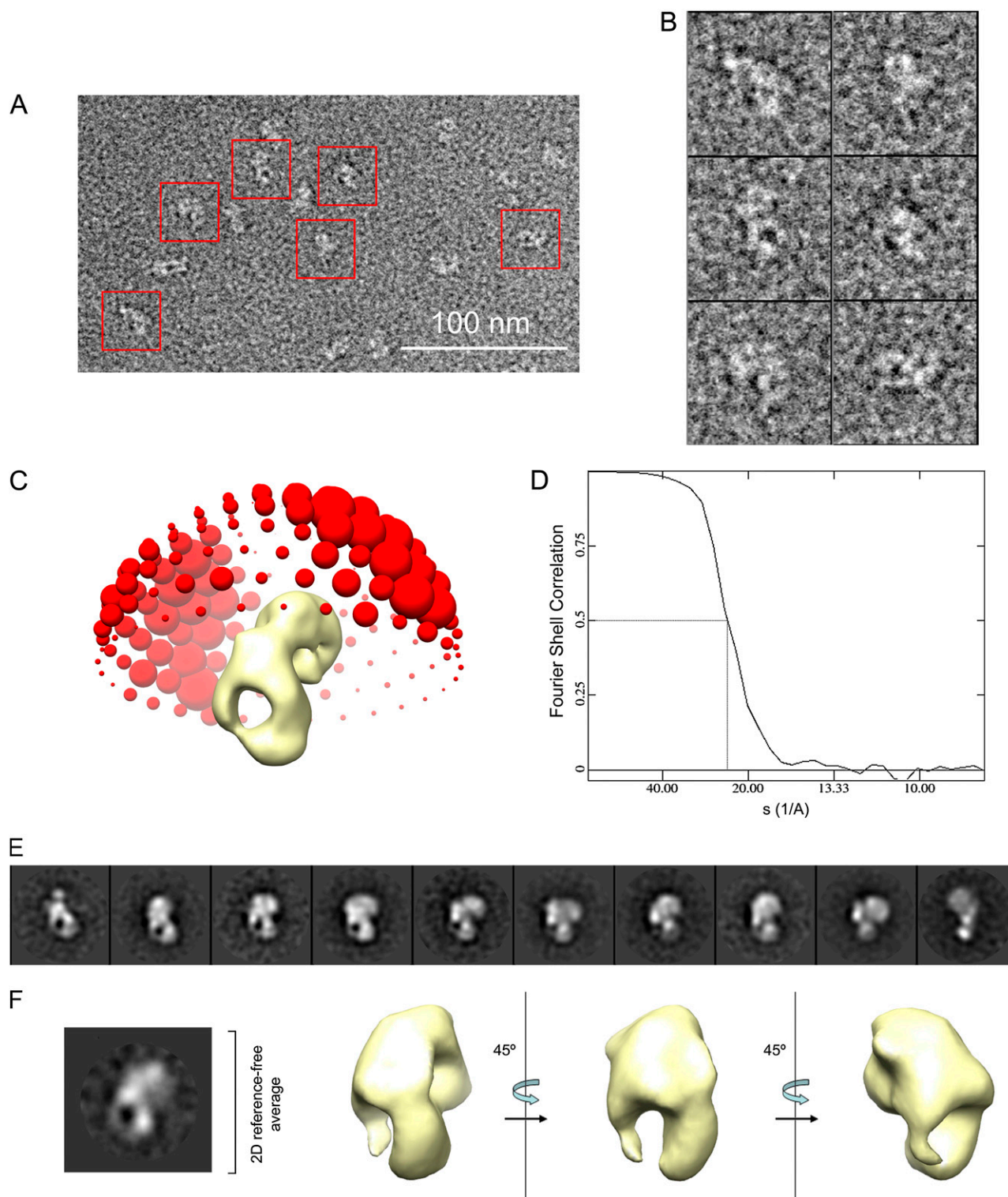


Fig. S2. EM of iC3b. (A) Typical field of iC3b is observed in the electron microscope, where several individual molecules have been boxed. (Scale bar: 100 nm.) (B) Gallery of the particles selected in A. (C) Angular coverage of the images in the dataset. The Euler angle of each image is represented as a red sphere, using XMIPP (4), whose diameter is proportional to the number of images assigned to each orientation after angular refinement. The images in the dataset corresponded to a large range of orientations along the longitudinal axis of the protein. (D) Fourier shell correlation for the reconstruction of iC3b is shown. The resolution of the structure was estimated at 24 \AA using a cross-correlation coefficient of 0.5. (E) Reference-free 2D averages of iC3b purified for this work. These were identical to those obtained for the commercial preparation from Calbiochem (Fig. 1). (F) RCT reconstruction of iC3b. (Left) Reference-free 2D average of iC3b at 0° tilt obtained after classification with maximum-likelihood methods using XMIPP is shown (4). Several views of the RCT structure (Right) obtained from the pairs of images corresponding to the average shown (Left). Despite the low resolution of the structure, the MG ring is clearly visible, as well as density at the top of the ring.

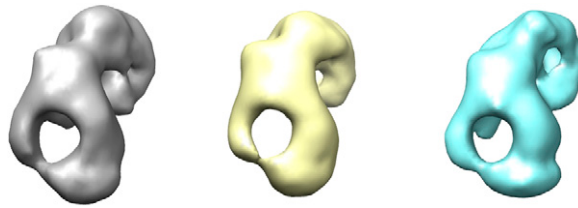


Fig. S3. Analysis of the conformational heterogeneity in iC3b. The dataset was classified into three homogeneous subsets using 3D maximum-likelihood classification (7). A similar view of each of the three structures obtained after classification is shown, and each structure is colored differently. The conformation of the three structures obtained was found to be very similar at the level of the resolution of these studies.

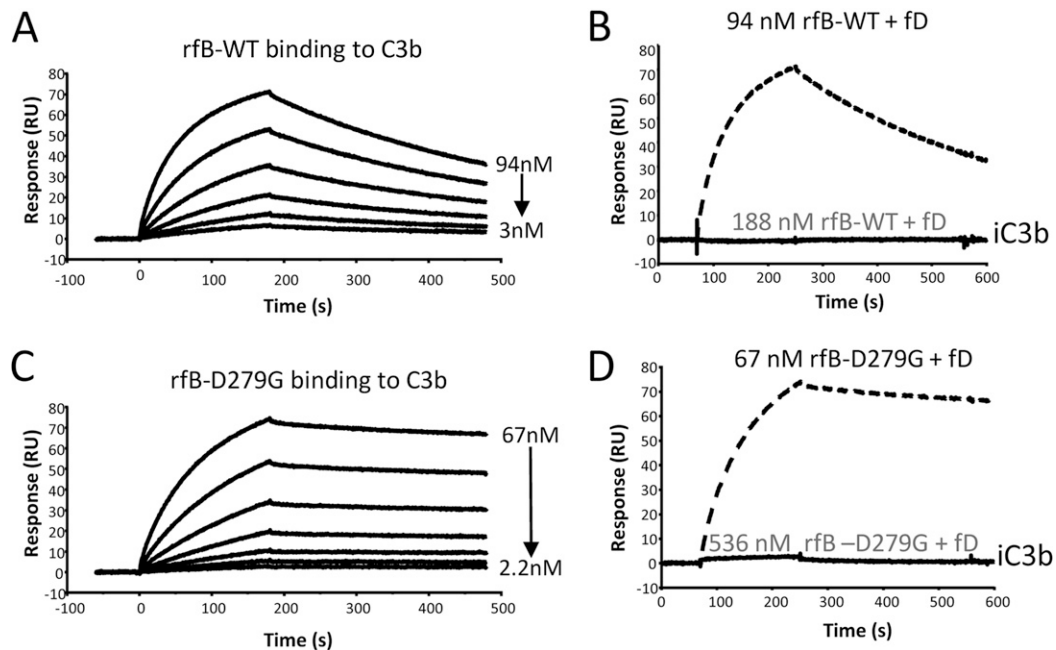


Fig. 54. fB does not form a convertase with iC3b. It is well established that iC3b does not interact with fB; therefore, it cannot build a C3 convertase. These ideas were challenged recently (1) by experiments showing that iC3b can assemble an active C3 convertase with a disease-associated fB mutant (D279G) that presents increased affinity for C3b. Because these data raised the possibility that the binding sites for fB in C3b are not fully disrupted in iC3b, we set up experiments to replicate these fB mutant data with our highly purified C3b and iC3b preparations. C3b (A and C, 510 RU) and iC3b (B and D, 501 RU) were immobilized on the chip surface, and recombinant fB (rFB)-WT (A and B) or rFB-D279G (C and D) was flowed across at varying concentrations in the presence of Mg^{2+} and fD [in 10 mM Hepes (pH 7.4) and 100 mM NaCl]. Convertase was formed efficiently on C3b. rFB-WT did not form convertase on iC3b (B), and minimal binding of rFB-D279G to iC3b was only discerned at very high concentrations (D). Black dashed lines in C and D indicate binding of rFB-WT or rFB-D279G to C3b.

1. Roumenina LT, et al. (2009) Hyperfunctional C3 convertase leads to complement deposition on endothelial cells and contributes to atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 114: 2837–2845.

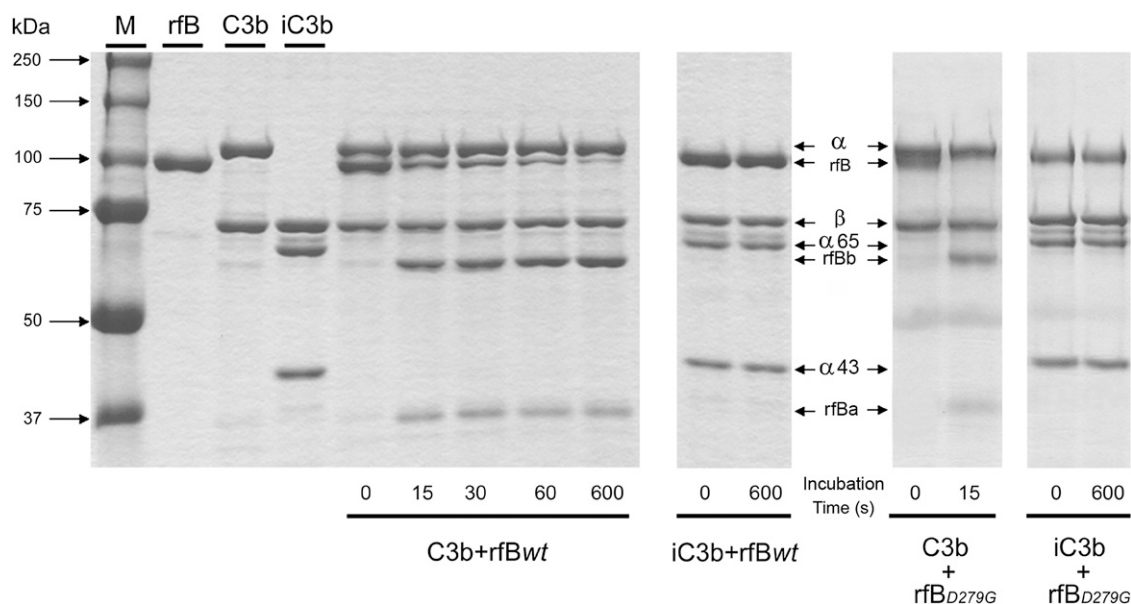


Fig. S5. iC3b does not induce fB cleavage in the presence of fD. To determine whether binding to iC3b might result in activation of fB, iC3b was incubated with recombinant fB-wild type and rFB-D279G in the presence of fD at 37 °C. rFB, recombinant fB; wt, wild type. The time course of the proteolytic cleavage of rFB and rFB-D279G in the presence of C3b or iC3b (both at 462 μ M), after adding the protease fD, is shown. Proteins were incubated at the indicated times, and samples were analyzed using 10% PAGE. Cleavage of fB was followed by the appearance of the Ba and Bb products of the digestion. Our failure to obtain evidence that iC3b interacts with fB and/or causes its proteolysis by fD is consistent with early data and with the iC3b structural data presented in this report. Our conclusion is that the fB binding site in C3b is disrupted in iC3b, dramatically reducing the overall affinity between fB and iC3b and preventing AP C3-convertase formation on iC3b.

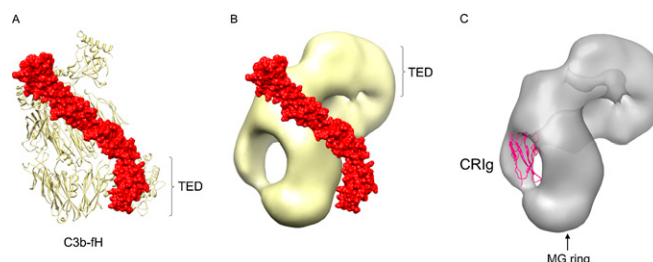


Fig. S6. Conformation of iC3b is compatible with CRlg binding and incompatible with fH binding. (A) Atomic structure of the C3b:fH(SCR1-4) complex (1). fH is rendered as a surface and colored in red. C3b is shown as yellow ribbons. (B) 3D-EM structure of iC3b, where the atomic structure of fH was superimposed as it is found in the C3b:fH(SCR1-4) complex (1). This model was obtained by aligning the MG rings of C3b in the C3b:fH(SCR1-4) complex (1) and the MG ring of the EM structure of iC3b. The movement of the TED domain in iC3b disrupts some of interaction sites of C3b for fH. (C) Model for the interaction of iC3b with CRlg. The structure of the complex between C3b and CRlg (PDB ID code 2ICF) (2) was aligned with iC3b using the MG ring as a reference for the alignment.

1. Wu J, et al. (2009) Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol* 10:728-733.
2. Wiesmann C, et al. (2006) Structure of C3b in complex with CRlg gives insights into regulation of complement activation. *Nature* 444:217-220.

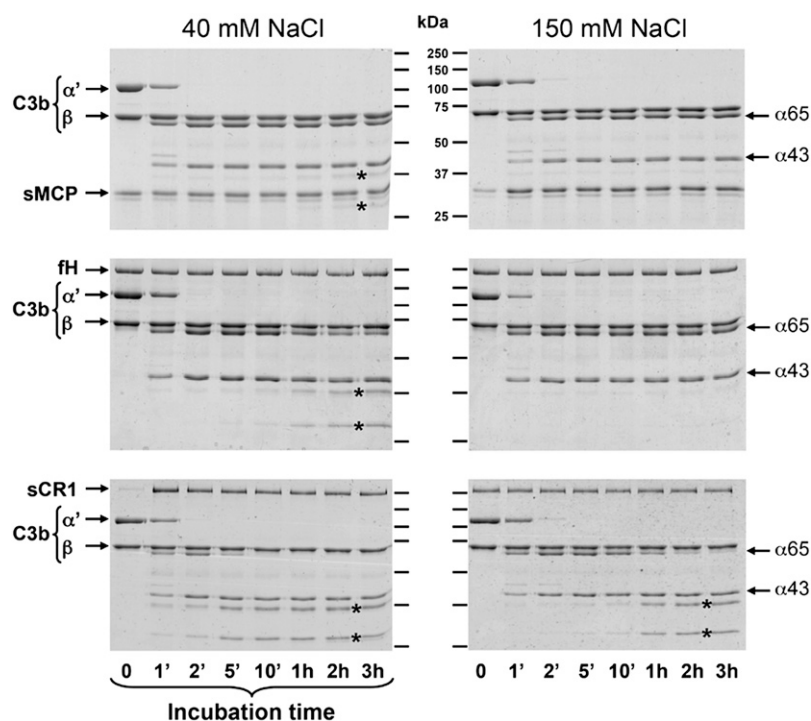


Fig. S8. Conformation of iC3b influences fl-mediated cleavage in the presence of cofactors fH, sMCP, and sCR1. Cleavage of C3b by fl in the presence of sMCP (*Top*), fH (*Middle*), or sCR1 (*Bottom*) using conditions of low ionic strength (40 mM NaCl) and physiological ionic strength (150 mM NaCl). The products resulting from the cleavage of the α 6 chain of iC3b have been labeled with an asterisk. In agreement with early data in the literature, addition of each of the three regulators resulted in very rapid cleavage of C3b into iC3b by fl, indicating that the structure of C3b allows efficient binding of the regulators fH, sMCP, CR1, and, subsequently, fl. In contrast, cleavage of iC3b into C3dg and C3c in the presence of sCR1 is slow and dependent on ionic strength. Importantly, clearly, fH and, minimally, sMCP are able to induce some cleavage of iC3b by fl in low-salt conditions (40 mM NaCl).

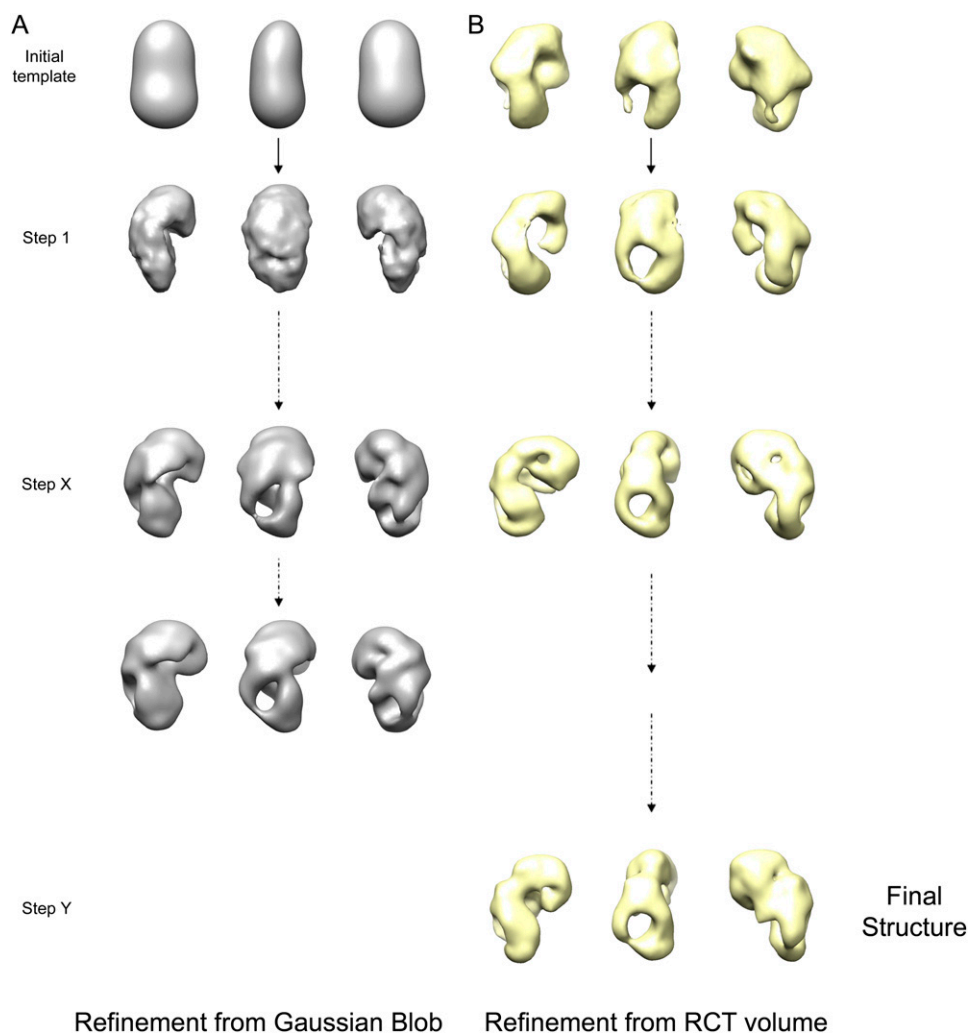


Fig. S9. 3D reconstruction of iC3b using a Gaussian blob as an initial template. (A) Dataset of iC3b images was refined using a Gaussian blob as a starting reference. (B) Despite the absence of bias, after a few steps of refinement, the reconstruction acquired structural features very similar to those observed when the dataset was refined from the RCT structure.

Table S1. Model-independent parameters obtained from SAXS data and theoretical parameters calculated from EM and X-ray diffraction structures

Species		R_G^* , Å	D_{\max}^\dagger , Å	Molecular mass (SAXS) ‡ , kDa
SAXS	C3	49.90 ± 0.04	~ 175	~ 181
	C3b	56.30 ± 0.06	~ 197	~ 169
	iC3b	49.5 ± 0.1	~ 183	~ 164
EM	iC3b	48.0	~ 154	n.a.
XRD	C3	51.8	158	n.a.
	C3b	54.8	172	n.a.

* R_G according to the Guinier approximation (13) for SAXS data and calculated parameters from EM and XRD structures. XRD, X-ray diffraction.

[†] Averaged experimental D_{\max} from SAXS data and calculated parameters from EM and XRD structures.

[†]Molecular mass (SAXS) given by Porod volume (1). n.a., not applicable.

1. Porod G (1982) *Small Angle X-Ray Scattering*, eds Glatter O, Kratky O (Academic, London), pp 17–51.

Structural insights on complement activation

Martín Alcorlo^{1,*}, Andrés López-Perrote^{1,*}, Sandra Delgado², Hugo Yébenes¹, Marta Subías¹, César Rodríguez-Gallego¹, Santiago Rodríguez de Córdoba^{1,3} and Oscar Llorca¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

² BioGUNE, Unidad de Biología Estructural – Ed. 800, Derio, Bizkaia, Spain

³ Centro Investigaciones Biológicas, Ciber de Enfermedades Raras, Madrid, Spain

Keywords

C3b; complement; electron microscopy; iC3b; thio-ester-containing domain

Correspondence

O. Llorca, Centro de Investigaciones Biológicas (CIB), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Spanish National Research Council, CSIC), Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain
Fax: +34 91 5360432
Tel: +34 91 8373112 x4446
E-mail: ollorca@cib.csic.es

*These authors contributed equally.

(Received 1 June 2015, revised 6 July 2015, accepted 4 August 2015)

doi:10.1111/febs.13399

The proteolytic cleavage of C3 to generate C3b is the central and most important step in the activation of complement, a major component of innate immunity. The comparison of the crystal structures of C3 and C3b illustrates large conformational changes during the transition from C3 to C3b. Exposure of a reactive thio-ester group allows C3b to bind covalently to surfaces such as pathogens or apoptotic cellular debris. The displacement of the thio-ester-containing domain (TED) exposes hidden surfaces that mediate the interaction with complement factor B to assemble the C3-convertase of the alternative pathway (AP). In addition, the displacement of the TED and its interaction with the macroglobulin 1 (MG1) domain generates an extended surface in C3b where the complement regulators factor H (FH), decay accelerating factor (DAF), membrane cofactor protein (MCP) and complement receptor 1 (CR1) can bind, mediating accelerated decay of the AP C3-convertase and proteolytic inactivation of C3b. In the last few years, evidence has accumulated revealing that the structure of C3b in solution is significantly more flexible than anticipated. We review our current knowledge on C3b structural flexibility to propose a general model where the TED can display a collection of conformations around the MG ring, as well as a few specialized positions where the TED is held in one of several fixed locations. Importantly, this conformational heterogeneity in C3b impacts complement regulation by affecting the interaction with regulators.

Role of TED relocation in complement activation and regulation

Complement is a major component of innate immunity with crucial roles in microbial killing, apoptotic cell clearance, immune complex handling and modulation of adaptive immune responses. During complement activation, three activation pathways converge in the cleavage of the protein C3 to generate the activated fragment C3b. The transition from C3 to C3b involves

large conformational changes [1–3]. These changes affect several regions in the C3 molecule, but the repositioning of the thio-ester-containing domain (TED) provides a key requirement for complement activation. In C3, the TED blocks most of the surfaces potentially capable of binding to other complement components, thus producing a rather inactive molecule. In C3b, the

Abbreviations

AP, alternative pathway; C3bB, C3-proconvertase; CR1, complement receptor 1; CUB, complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1; DAF, decay accelerating factor; EM, single molecule transmission electron microscopy; FB, factor B; FH, factor H; FI, factor I; MCP, membrane cofactor protein; MDFF, molecular dynamics flexible fitting; MG1, macroglobulin 1; SCR, short consensus repeat; TED, thio-ester-containing domain.

TED is displaced until it contacts the macroglobulin 1 (MG1) domain, exposing hidden surfaces and generating new ones that mediate interactions with other complement proteins involved in both complement activation and regulation. First, C3b exposes a reactive thio-ester that attaches covalently to the activating surface, restricting complement-mediated lysis and inflammation to the activation site. Second, regions for the interaction with factor B (FB) are exposed, and C3b can then assemble an unstable protease complex, named C3-proconvertase (C3bB), that eventually will generate the active C3-convertase of the alternative pathway (AP). Efficient activation of the complement system depends on an amplification loop in which the newly generated C3b forms more AP C3-convertase, amplifying the initial activation [4,5]. The complement system is also regulated by properdin, a protein that enhances the stability of the C3-convertase in the AP and promotes the local amplification of complement activation [6,7].

In addition, the repositioning of the TED generates an extended surface for the interaction with factor H (FH), membrane cofactor protein (MCP; CD46), decay accelerating factor (DAF; CD55) and complement receptor 1 (CR1). These regulators protect host cells from damage by complement [4,5].

Crystal structure of C3b

C3b is made of two polypeptide chains, β (residues 1–645) and α' (residues 727–1641), that together form a core of eight macroglobulin (MG1–MG8) domains with a linker domain inserted into domain MG6, a complement C1r/C1s, Uegf, Bmp1 (CUB) and a TED connected to MG7 and MG8, and a C345C domain attached to MG8. Several structures of C3b either alone [1–3] or in complex with other complement factors have been resolved over the years [8,9]. These structures revealed that the core of MG domains forms a ring decorated by C345C at the top and the CUB-TED module projecting downwards (Fig. 1). A comparison between the crystal structures of C3b and C3 revealed a large conformational change of the CUB-TED module in addition to movements in other segments of the protein [1,2].

As mentioned above, C3b can recognize several complement regulators. FH is the prototypical regulator of the AP, consisting of a single polypeptide of 20 short consensus repeats (SCRs) arranged in a continuous fashion [4,5]. FH binds to C3b, accelerates the decay of the AP C3-convertase enzyme and acts as a cofactor for the factor I (FI) mediated proteolytic inactivation of C3b, which generates iC3b. C3b binds

SCR1 through SCR4 in FH, as revealed by the crystal structure of C3b bound to the first four SCRs in FH [8] (Fig. 1), and this interaction is essential for the decay and FI cofactor activities of FH. SCR1 and SCR2 in FH contact the acidic α' N-terminal region and the MG7 domain in C3b, SCR3 binds the CUB domain and SCR4 interacts with the MG1 and the TED [8]. Thus, the interaction between the TED and MG1 domain in C3b is important for the recognition of FH. MCP, DAF and CR1 are thought to follow similar mechanisms [4,5]. In addition, SCR19 and SCR20 in FH contain a C3b/polyanion binding site implicated in preventing AP activation on host cells [10–12]. In conclusion, at the same time that activation of C3 to generate C3b allows formation of the C3-convertase and triggers the amplification loop, it also generates the way to be regulated.

Transmission electron microscopy, X-ray and neutron scattering reveal that C3b is a flexible molecule

The crystal structure of C3b, including some conformational variations observed in different crystals, has been presumed to represent the only or the most relevant functional conformation of this complement protein. The crystal structure revealed the structural bases for the attachment of the TED to physiological membranes, the activation and regulation of complement, and its proteolytic cleavage to generate iC3b. Despite this general assumption, in recent years several reports have provided evidence that other conformations of C3b are also detected under conditions in which the protein is not part of a crystal. Images of C3b obtained by Nishida *et al.* using single molecule transmission electron microscopy (EM) revealed views of C3b compatible with the crystal structure, but surprisingly some molecules also showed a TED detached from its canonical position [13]. This finding was reproduced by Alcorlo *et al.* [14] (Fig. 2A). These images suggested that the TED could occupy several positions in C3b and not only the one described by the crystal structures. In addition, Nishida *et al.* observed that C3(N), a form of C3 resulting from the spontaneous hydrolysis of C3 thio-ester bond by nucleophiles, revealed various conformations by EM, some with the TED in a similar position to the crystal structure of C3b but others showing different locations for the TED [13]. However, it is important to note that it cannot be ruled out that the conformation of C3b in the images obtained by EM could be partially affected by the technique. In these EM studies, C3b molecules were adsorbed to a carbon surface, washed and stained

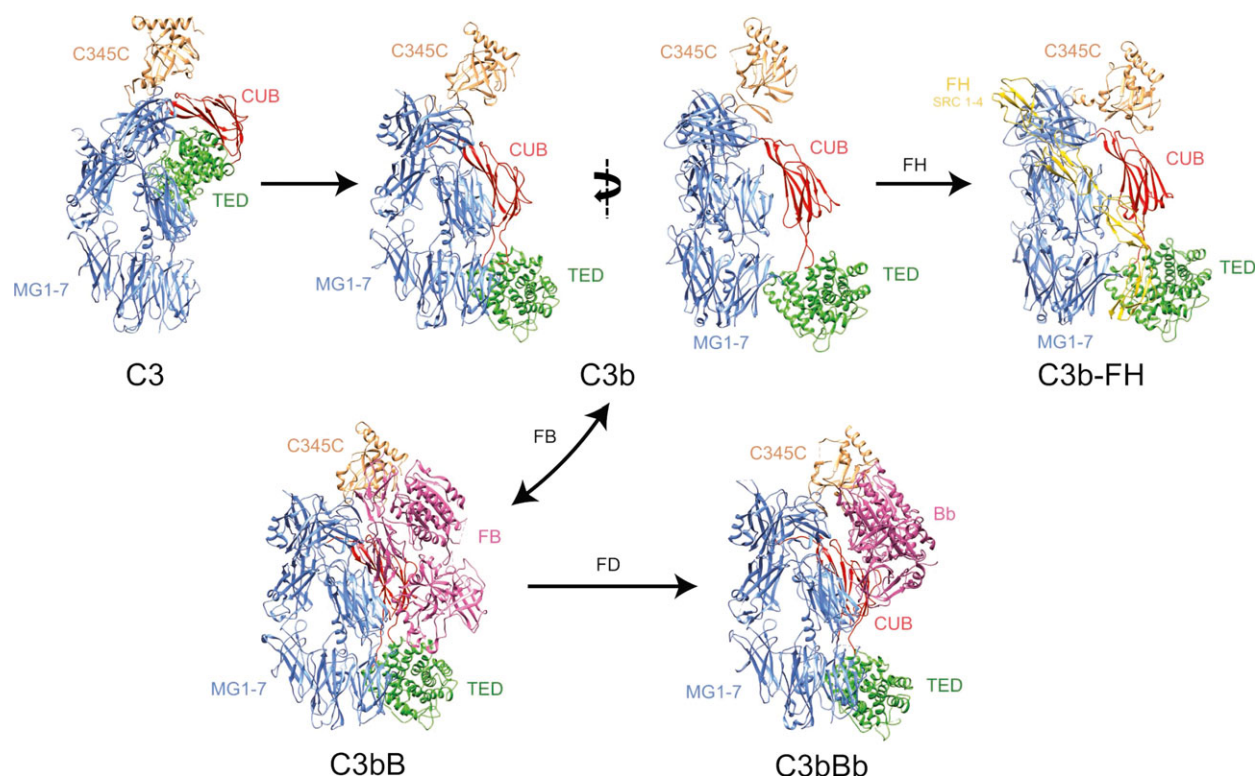


Fig. 1. Structures of C3, C3b and C3b complexes. Top centre: Two views of the crystal structure of C3b (PDB ID [2U07](#)) [1,2]. The MG ring (MG1–7) is coloured blue, C345C domain orange, CUB domain red and the TED green. Top right: One view of the complex between C3b and SCR1–4 in FH (PDB ID [2WII](#)) [8], with FH coloured yellow. Top left: One view of C3 (PDB ID [2A73](#)). Bottom: One view of the structure of C3bB (PDB ID [2XWJ](#)) and C3bBb (PDB ID [2WIN](#)), with FB coloured purple [3–5,9].

with uranyl acetate or uranyl formate to protect the sample from the electron beam and increase contrast. Attachment to the carbon surface together with the pH and ionic strength of the washing and staining solutions could potentially affect the conformation of C3b, although this is quite infrequent for molecules analysed by these methods. Interestingly, several studies using C3b in solution have corroborated the findings obtained using EM. Time-resolved fluorescence resonance energy transfer (FRET) measures using a fluorophore attached to the thiol group in the TED confirmed that, in solution, the TED is possibly flexible and retains some degree of mobility even in the presence of a fragment of FH corresponding to the first four SCRs [15]. Recently, analysis of the structure of C3b using analytical ultracentrifugation and X-ray and neutron scattering also indicated that the TED could detach from the MG ring [16]. The significance of these results was not analysed further, and it could not be ruled out that these were ‘outlier conformations’ or ‘defective/inactive protein’. However, recent reports provide evidence indicating that the conformational flexibility of C3b can have an impact in the

interaction with other proteins, especially in the context of mutations and polymorphisms (see below) [16,17].

We have now used C3b images from a sample purified from human plasma to obtain a better description of C3b conformational flexibility. This analysis used similar approaches and methodologies to previous work by our group [14], but the results are new and not part of a previous publication. A total of 32 595 images of individual C3b molecules were collected and subjected to reference free classification methods to group and average those images derived from similar views of the protein (Fig. 2A). C3b appeared on the EM support film in different orientations, but a typical view showed the MG ring clearly visible as well as globular densities corresponding to the C345C domain and TED at the top and at the lower part of the ring, respectively, as expected for the typical structure of C3b. In addition, EM revealed that a significant fraction of molecules showed the strong density corresponding to the TED adopting different locations around the MG ring. These images suggested a flexibility of the TED region, without contacting the MG

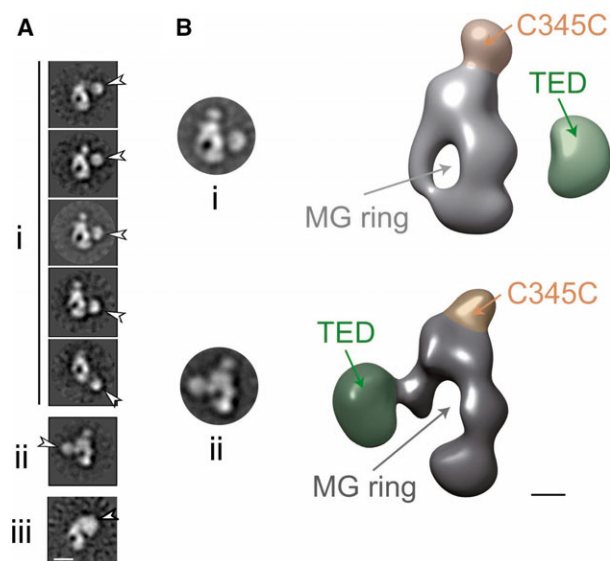


Fig. 2. Conformational flexibility of C3b revealed by EM. (A) C3b molecules observed in the electron microscope reveal several conformations. (i) Some conformations reflect the movement of the TED (labelled with an arrow) around the MG ring. (ii) An alternative conformation shows the TED attached to the MG3 domain. (iii) Some C3b molecule images show the TED stably placed at the top of the molecule, in the vicinity of C345C. Scale bar, 10 nm. (B) 3D structure of two C3b conformers (i, ii) obtained by EM. The locations of the TED (green), the C345C domain (orange) and the MG ring (grey) are indicated. In the bottom panel, the structure of the MG ring is partially incomplete due to effects of the staining agent used for the structure determination, as explained by Alcorlo *et al.* [18]. Scale bar, 25 Å.

ring, although preferential locations were found at the bottom end of the MG ring towards its right side, in agreement with the findings by Nishida *et al.* and Rodriguez *et al.* [13,16]. Also, images by Alcorlo *et al.* found two additional conformations, not clearly detected by other authors [14]. In these conformations, the TED was found in proximity to the MG3 or the C345C domain (Fig. 2A).

3D description of C3b structural flexibility

There have been several attempts to describe the 3D structure of these alternative conformations. Nishida *et al.* [13] generated models of C3b based on the rigid-body movement of domains in the crystal structure to find the conformation where the theoretical projections of the model predicted the experimental images of C3b. These models suggested that the TED could detach from the core ring formed by the MG domains. Nevertheless, the models were built to match the experimental 2D projections of C3b and therefore they

only provided a tentative indication of the conformations in C3b. More recently, Rodriguez *et al.* have analysed the solution structure of C3b using analytical ultracentrifugation and X-ray and neutron scattering [16]. They used scattering modelling to reveal that in physiological 137 mM NaCl the TED and MG1 domain are separated and thus C3b displayed an extended structure, distinct from that described in the crystal.

To better understand the conformational heterogeneity of C3b we have determined the 3D structures of the most significant conformations using EM. For this, we first used *ab initio* structures determined by the random conical tilt method and a 3D classification and 3D processing strategy [14,18] (Fig. 2B). As mentioned earlier, these are new results, not published before. The MG ring and C345C domains were readily identified, whereas the TED appeared as a globular density placed at a certain distance from the rest of the molecule. These structures revealed several sub-groups of conformations. Some conformers were very similar but displayed some variations in the location of the TED. In all these cases, the TED appeared separated from the MG ring but at the same side as in the crystal structure. In addition, one conformer was clearly different from the rest, whose distinctive feature was the presence of the TED in proximity to MG3 (Fig. 2B). Interestingly, this conformation was recently described as part of the properdin–C3bBb complex [18]. Finally, a third type of conformation was also detected in 2D (i.e. with the TED in close proximity to the C345C domain) (Fig. 2A), but we have been unable to obtain its 3D structure since this conformer was poorly represented in the data set.

Structural basis of C3b flexibility

To further study the structural basis of the conformational heterogeneity detected, we focused our study on the most abundant conformation observed in the image processing performed here. This conformer shows that the TED is clearly displaced in comparison with the crystallographic structure (PDB ID [2I07](#)) [1,3], and we wondered whether the length of the double linker connecting the CUB domain and TED (including residues P964 to D974 and K1262 to L1270 from chain β) might allow this reorganization. Otherwise, unfolding of the CUB domain should be a requirement to enable the translocation of the TED visualized by EM. We used molecular dynamics flexible fitting (MDFF) in order to obtain an atomic model representing the conformational state captured by EM following standard

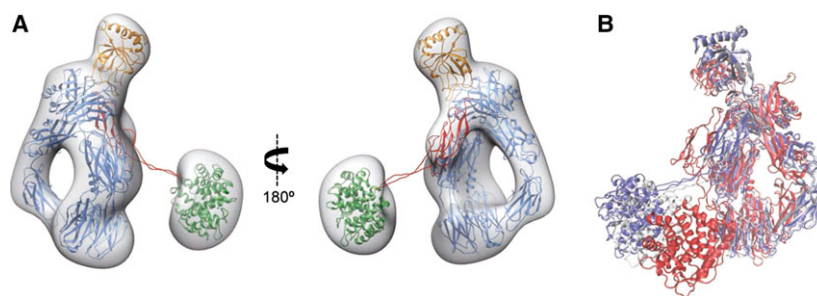


Fig. 3. Structural basis of C3b flexibility. (A) An atomic model of C3b was obtained by applying MDFF to one of the C3b conformers obtained using EM of the crystal structure of C3b structure (PDB ID [2I07](#)) [1,2]. Molecular dynamic simulations were carried out with NAMD 2.9 [20] through the MDFF plug-in [21]. The 3D structure of C3b is shown as a grey transparent density. The MG ring is displayed in blue. The C345C domain, CUB domain and TED are in orange, red and green, respectively. (B) Representation of the trajectories during MDFF of the atomic structure of C3b. The first frames in the trajectory are shown in red, the middle in white and the end in blue.

methodology (Fig. 3A). For these simulations, the TED was moved first to fit the density of the domain in the EM map, and then movements of the CUB domain were allowed to accommodate within the remaining

density. The simulations showed that a movement of the TED with respect to its position in the crystal structure, thanks to the linker that connects the TED with the CUB domain, could be sufficient to fit the crystal

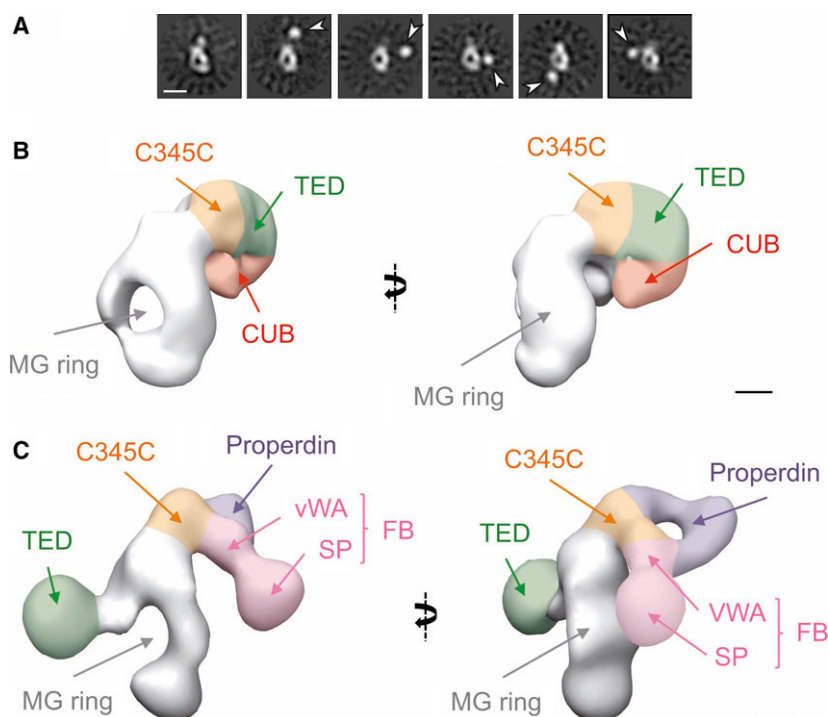


Fig. 4. Flexibility of iC3b and properdin-stabilized C3-convertase. (A) Images of iC3b analysed by EM display a conformational flexibility where the TED moves around the MG ring. The images shown here were obtained for this work, but they are similar to those published before [13]. Scale bar, 10 nm. (B) Two views of a 3D structure of iC3b, obtained by EM (EMDB ID EMD-1908), showing a TED (green) attached to the top of the ring. The putative locations of the C345C domain (orange), CUB domain (red) and TED are indicated based on the assumptions by Alcorlo *et al.* [14], but these are only tentative and remain speculative at the current resolution of this structure. Scale bar, 25 Å. (C) Two views of the structure of properdin–C3-convertase complex resolved by Alcorlo *et al.* (EMDB ID EMD-2403) [18]. A fragment of properdin (purple) is found to interact with the regions in C3b and FB, stabilizing the complex. The structure of the MG ring is partially incomplete due to effects of the staining agent used for the structure determination, as explained in Alcorlo *et al.* [18]. The structure shows the TED located in a similar position to that found for the C3b conformer labelled (ii) in Fig. 2. Scale bar, 25 Å. vWA, von Willebrand domain; SP, serine protease domain in FB.

structure into the EM map (see trajectories in Fig. 3B and Movie S1).

Summarizing the evidence described above, a model emerges where C3b can display a collection of conformations, since the contacts sustaining the interaction of the TED with the MG ring are not strong. These contacts could be affected by mutations, polymorphisms and conditions such as pH and ionic strength. The connection between the CUB domain and TED has sufficient length to enable the conformational rearrangements observed by EM. Nonetheless, it is reasonable to assume that some flexibility of the CUB domain could also contribute to the conformational heterogeneity of C3b.

iC3b recapitulates the flexibility observed in C3b

Interestingly, the study of the structure of iC3b, a fragment of C3b generated after cleavage by FI, using EM has also revealed conformational flexibility and two apparently distinctive structural models. On the one hand, images of iC3b alone and in complex with complement receptor 4 (CR4, integrin $\alpha X\beta 2$, CD11c/CD18) showed that the position of the TED fluctuates around the MG ring [13,19] (Fig. 4A). The observed conformational flexibility recapitulates the findings of C3b but the EM images suggest an enhanced degree of freedom for the TED, probably correlated with the cleavage at the CUB domain. Such degree of flexibility implies that the conventional techniques used to average similar molecule images results in many cases in images where only the MG ring and the C345C domain are visualized whereas the density corresponding to the TED is smeared out and not clearly visible [13,19]. The flexibility of the TED in iC3b could rationalize that CR1-mediated cleavage of C3b to generate iC3b is very fast whereas cleavage of iC3b to produce C3dg and C3c fragments is very slow. We suggest that a very mobile TED in iC3b would interfere with proper binding of CR1 to iC3b.

In contrast to this flexible conformation of iC3b, another EM study revealed that the majority of the iC3b molecules in the experiment agreed with a defined conformation where the TED was placed in the vicinity of the C345C domain [14] (Fig. 4B). Quite surprisingly, in this conformation the TED moves to positions more similar, although different, to those found in C3, and consequently iC3b would be unable to assemble the C3-convertase due to the disruption of the binding site for FB. In agreement with this model, an almost imperceptible binding of FB to iC3b was

found using surface plasmon resonance [14]. The structural and molecular bases for such arrangement are currently obscure, but it is possible that a flexible TED, either in C3b or iC3b, can be stabilized in a few defined positions through alternative intramolecular interactions to those described in the crystal structure of C3b. iC3b interacts with CR3 and CR4 receptors, and current evidence suggests that the interaction with these receptors involves regions of the TED and regions in the rest of the protein. How this can occur is unknown since it involves the recognition of segments of iC3b that are quite distant in the context of the flexible conformation. It is tempting to speculate that the stabilization of the TED at a defined position could generate the 3D arrangement to approximate the TED to other segments of iC3b required for the recognition of CR3 and/or CR4.

Some unconventional conformations of C3b can be stabilized by properdin

Properdin is a complement regulator that stabilizes the C3-convertase and thus plays important roles in

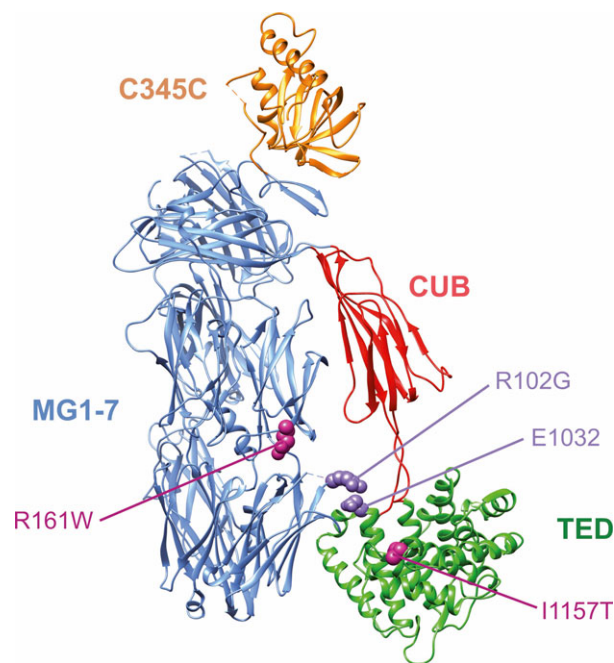


Fig. 5. Residues and mutations in C3b that correlate with C3b flexibility. One view of the crystal structure of C3b (PDB ID [2I07](#)) [1,2] is shown highlighting several residues and mutations with functional significance. A salt bridge between E1032 and R102 is affected by ionic strength [16]. The C3S (Arg102) versus C3F (Gly102) polymorphism, indicated as R102G, could also affect this salt bridge. Residues involved are shown in purple. Two prevalent aHUS-associated mutations in C3, R161W and I1157T, represented in dark pink, show defects in complement regulation [17].

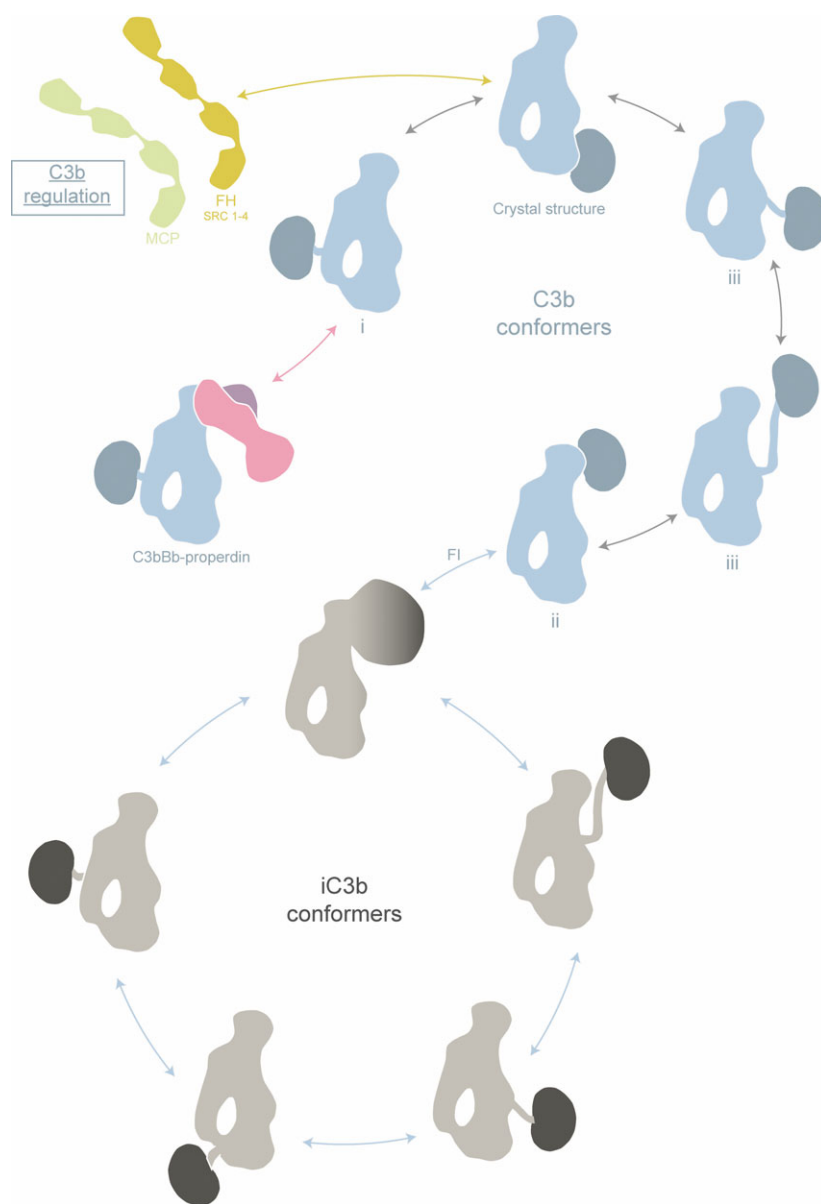


Fig. 6. Structural and functional model of C3b flexibility. Cartoon representation highlighting the positioning of the TED around the MG ring. The TED can display a range of flexible conformations around the MG ring, but it can also be stably bound to several regions in the MG ring. Three of these regions have been described, which are expected to impact how C3b is regulated. One of these conformations has been found to be enriched in the context of a complex between C3-convertase and properdin, although the more 'conventional' conformation of the TED was also found in the C3bBb-convertase complex [18]. iC3b recapitulates some of this conformational flexibility.

antibacterial defence as well as in inflammatory or autoimmune diseases [6,7]. Recent structural work analysing the structure of the properdin–C3bBb complex by EM suggested that properdin functions by holding together C3b and Bb, thus enhancing the stability of the interaction [18]. Unexpectedly, the structure also revealed that the C3b component in a significant fraction of the properdin–C3bBb complexes was exposing a large conformational rearrangement that we can now correlate with one of the conformations adopted by C3b (Fig. 4C). Such rearrangement was suggested to affect binding to other complement regulators, limiting the accelerated decay of C3-conver-

tase and therefore contributing to the functional properties of properdin. One possible model is that properdin contributes to stabilizing one of the several conformational positions of the TED in C3b, as we have previously suggested for iC3b.

Functional implications of C3b flexibility

Overall, the available evidence shows that C3b displays a collection of conformations, suggesting that the contacts sustaining the interaction of the TED with the MG ring are not strong and therefore can

be affected by mutations, polymorphisms and conditions such as pH and ionic strength. In addition, this conformational flexibility can have important functional consequences since the movements of the TED could remove essential structural determinants for recognition by C3b of some regulators such as FH and MCP [5]. As revealed by the crystal structure of the complex between C3b and SRC1–SCR4 of FH [8] (Fig. 1), this interaction causes the decay of the C3-convertase. This complex is maintained through several contacts between FH and C3b, but the interaction of SCR4 with the TED is essential. In addition, the TED also contributes to hold SCR19 and SCR20 and engage FH to membranes [10–12]. Therefore, it could be anticipated that displacements of the TED should impact the regulation of C3b and the complement pathway, and recent evidence is accumulating to support this hypothesis. iC3b does not bind FH in surface plasmon resonance experiments [14] and FI-dependent proteolytic inactivation of C3b in the presence of MCP was slowed down in the context of the C3bBb–properdin complex [18]. These results could be interpreted as resulting from a poor interaction of C3b with FH and MCP due to the movement of the TED. In addition, the work by Rodríguez *et al.* has shown that a salt bridge between residue Glu1032 at the TED and residue 102 at the first MG domain is affected by ionic strength, suggesting that this could explain the differential regulation of the C3S (Arg102) versus C3F (Gly102) polymorphisms [16] (Fig. 5). Interestingly, Martínez-Barricarte *et al.* has recently investigated the functional consequences of two prevalent aHUS-associated mutations in C3, R161W and I1157T, providing evidence that a displacement of the TED from the MG ring in C3b in the mutants correlates with defects in regulation associated with these mutations [17] (Fig. 5).

Concluding remarks

The crystal structures of C3 and C3b revealed that the TED functions as a ‘switch’ that controls complement activation and regulation [1–3,5,8,9]. In C3, the TED blocks regions involved in binding to FB, and it also occludes a reactive thio-ester, thus effectively preventing complement activation. In contrast, C3b is an active molecule, as a result of the repositioning of the TED, which interacts now with the MG1 domain. Finally, delocalization of the TED in iC3b affects the efficiency of its degradation *in vitro*, and we propose that this can extend its lifetime with functional consequences. Recent evidence obtained

by biophysical techniques using C3b in solution has now revealed that C3b displays a richer collection of conformations than those shown by the crystal structures (Fig. 6).

We propose a general model where the TED can display a collection of flexible conformations around the MG ring, only restricted by the conformational limits imposed by the connection between the TED and the rest of the molecule (Fig. 6). This multitude of localizations of the TED in C3b can contribute to tune its regulation. This mechanism would somehow recapitulate the general function of the TED when it transits from C3 to C3b and iC3b. Within this model the TED is frequently found delocalized around the MG ring, but it can also lock to several specialized positions where specific interactions can hold the TED. At least three of these defined positions have been described: the ‘conventional’ position of the TED as observed in the crystal structures, and conformations placing the TED in contact with the C345C or MG3 domains. C3b has binding sites for complement regulators (FH, DAF, MCP, CR1), and evidence suggests that the conformational flexibility of C3b will impact how and if these interactions can occur [16,17], thus adding an unanticipated complexity in complement regulation.

Acknowledgements

This work was funded by the Spanish Government (SAF2011-22988 and SAF2014-52301-R to OL; SAF2011-26583 to SRdC), the EU (Eurenomics to SRdC) and by the Government of the Autonomous Region of Madrid (S2010/BMD-2316 to OL and SRdC).

Author contributions

M. Alcorlo performed image processing and simulations shown in the manuscript, with the help of S. Delgado. A. López-Perrote has prepared all the figures. O. Llorca and S. Rodríguez de Cordoba contributed the major concepts in the review, with the help and discussions from the rest of authors in the review. O. Llorca wrote the manuscript with the help of S. Rodríguez de Cordoba and with the contribution of M. Alcorlo when describing the experimental part.

References

- 1 Janssen BJ, Christodoulidou A, McCarthy A, Lambris JD & Gros P (2006) Structure of C3b reveals

- conformational changes that underlie complement activity. *Nature* **444**, 213–216.
- 2 Wiesmann C, Katschke KJ, Yin J, Helmy KY, Steffek M, Fairbrother WJ, McCallum SA, Embuscado L, DeForge L, Hass PE *et al.* (2006) Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. *Nature* **444**, 217–220.
 - 3 Gros P, Milder FJ & Janssen BJ (2008) Complement driven by conformational changes. *Nat Rev Immunol* **8**, 48–58.
 - 4 Rodriguez de Cordoba S, Harris CL, Morgan BP & Llorca O (2011) Lessons from functional and structural analyses of disease-associated genetic variants in the complement alternative pathway. *Biochim Biophys Acta* **1812**, 12–22.
 - 5 Lea SM & Johnson S (2012) Putting the structure into complement. *Immunobiology* **217**, 1117–1121.
 - 6 Kemper C, Atkinson JP & Hourcade DE (2010) Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol* **28**, 131–155.
 - 7 Ruseva MM, Vernon KA, Leshner AM, Schwaebler WJ, Ali YM, Botto M, Cook T, Song W, Stover CM & Pickering MC (2013) Loss of properdin exacerbates C3 glomerulopathy resulting from factor H deficiency. *J Am Soc Nephrol* **24**, 43–52.
 - 8 Wu J, Wu YQ, Ricklin D, Janssen BJ, Lambris JD & Gros P (2009) Structure of complement fragment C3b-factor H and implications for host protection by complement regulators. *Nat Immunol* **10**, 728–733.
 - 9 Forneris F, Ricklin D, Wu J, Tzekou A, Wallace RS, Lambris JD & Gros P (2010) Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science* **330**, 1816–1820.
 - 10 ES Harrison R, Gorham RD Jr & Morikis D (2015) Energetic evaluation of binding modes in the C3d and Factor H (CCP 19–20) complex. *Protein Sci* **24**, 789–802.
 - 11 Blaum BS, Hannan JP, Herbert AP, Kavanagh D, Uhrin D & Stehle T (2015) Structural basis for sialic acid-mediated self-recognition by complement factor H. *Nat Chem Biol* **11**, 77–82.
 - 12 Morgan HP, Schmidt CQ, Guariento M, Blaum BS, Gillespie D, Herbert AP, Kavanagh D, Mertens HD, Svergun DI, Johansson CM *et al.* (2011) Structural basis for engagement by complement factor H of C3b on a self surface. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 463–470.
 - 13 Nishida N, Walz T & Springer TA (2006) Structural transitions of complement component C3 and its activation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19737–19742.
 - 14 Alcorlo M, Martinez-Barricarte R, Fernandez FJ, Rodriguez-Gallego C, Round A, Vega MC, Harris CL, de Cordoba SR & Llorca O (2011) Unique structure of iC3b resolved at a resolution of 24 Å by 3D-electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 13236–13240.
 - 15 Pechtl IC, Neely RK, Dryden DT, Jones AC & Barlow PN (2011) Use of time-resolved FRET to validate crystal structure of complement regulatory complex between C3b and factor H (N terminus). *Protein Sci* **20**, 2102–2112.
 - 16 Rodriguez E, Nan R, Li K, Gor J & Perkins SJ (2015) A revised mechanism for the activation of complement C3 to C3b: a molecular explanation of a disease-associated polymorphism. *J Biol Chem* **290**, 2334–2350.
 - 17 Martinez-Barricarte R, Heurich M, Lopez-Perrote A, Tortajada A, Pinto S, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P, Morgan BP, Llorca O, Harris CL *et al.* (2015) The molecular and structural bases for the association of complement C3 mutations with atypical hemolytic uremic syndrome. *Mol Immunol* **66**, 263–273.
 - 18 Alcorlo M, Tortajada A, Rodriguez de Cordoba S & Llorca O (2013) Structural basis for the stabilization of the complement alternative pathway C3 convertase by properdin. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 13504–13509.
 - 19 Chen X, Yu Y, Mi LZ, Walz T & Springer TA (2012) Molecular basis for complement recognition by integrin α X β 2. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 4586–4591.
 - 20 Phillips JC, Braun R, Wang W, Gumbart J, Tajkhorshid E, Villa E, Chipot C, Skeel RD, Kale L & Schulten K (2005) Scalable molecular dynamics with NAMD. *J Comput Chem* **26**, 1781–1802.
 - 21 Trabuco LG, Villa E, Mitra K, Frank J & Schulten K (2008) Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure* **16**, 673–683.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

Movie S1. Simulations showing that movements of the TED are sufficient to fit the crystal structure of C3b into an EM map.

Research Article

Functional and structural characterization of four mouse monoclonal antibodies to complement C3 with potential therapeutic and diagnostic applications

Marta Subías Hidalgo^{*1,2}, Hugo Yébenes^{*1}, César Rodríguez-Gallego^{*1},
Adrián Martín-Ambrosio^{1,2}, Mercedes Domínguez³, Agustín Tortajada^{1,2},
Santiago Rodríguez de Córdoba^{†1,2} and Oscar Llorca^{†1}

¹ Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

² Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Raras, Madrid, Spain

³ Servicio de Inmunología Microbiana, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Investigación Carlos III Madrid, Spain

C3 is the central component of the complement system. Upon activation, C3 sequentially generates various proteolytic fragments, C3a, C3b, iC3b, C3dg, each of them exposing novel surfaces, which are sites of interaction with other proteins. C3 and its fragments are therapeutic targets and markers of complement activation. We report the structural and functional characterization of four monoclonal antibodies (mAbs) generated by immunizing C3-deficient mice with a mixture of human C3b, iC3b and C3dg fragments, and discuss their potential applications. This collection includes three mAbs interacting with native C3 and inhibiting AP complement activation; two of them by blocking the cleavage of C3 by the AP C3-converterase and one by impeding formation of the AP C3-converterase. The interaction sites of these mAbs in the target molecules were determined by resolving the structures of Fab fragments bound to C3b and/or iC3b using electron microscopy. A fourth mAb specifically recognizes the iC3b, C3dg, and C3d fragments. It binds to an evolutionary-conserved neoepitope generated after C3b cleavage by FI, detecting iC3b/C3dg deposition over opsonized surfaces by flow cytometry and immunohistochemistry in human and other species. Because well-characterized anti-complement mAbs are uncommon, the mAbs reported here may offer interesting therapeutic and diagnostic opportunities.

Keywords: Complement inhibition · C3 · C3b · C3bBb convertase · Monoclonal antibody



Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site

Introduction

Complement is an essential component of innate immunity and one of the major triggers of inflammatory responses. It plays a crucial role in microbial killing, apoptotic cell clearance, immune complex handling, and modulation of adaptive immune responses [1, 2]. Complement is initiated by three activation pathways, the

classical pathway (CP), the lectin pathway (LP), and the alternative pathway (AP). The critical step in these activation pathways is the formation of labile protease complexes, termed C3-converterases (C3bBb in the AP; C4b2a in the CP/LP) that cleave C3 to generate the active fragment, C3b. When C3b is generated, a reactive thioester is exposed which permits covalent binding of C3b to hydroxyl or primary amine groups on the activating surface. C3b

Correspondence: Prof. Oscar Llorca
e-mail: ollerca@cib.csic.es; srdecordoba@cib.csic.es

^{*}Shared first authorship.

[†]Shared last authorship.

Table 1. Characterization of the anti-C3 mAbs

mAbs	Isotype	Fragment recognition	Domain recognition	KD(M)	Ka ($M^{-1}s^{-1}$)	Kd(s^{-1})	Functional impact on C3
C3-16.4	IgG1	C3b, iC3b, C3c	MG2, MG6	1.2 nM	3.7×10^4	4.4×10^{-5}	Blocks AP C3-convertase formation
C3-12.17	IgG2a	C3b, iC3b, C3c	MG3, MG4	63 nM	7.8×10^4	5×10^{-5}	Blocks C3 activation by AP C3-convertase
C3-42.3	IgG2a	C3b, iC3b, C3c	MG4, MG5	0.73 nM	–	–	Blocks C3 activation by AP C3-convertase
C3-12.2	IgG1	iC3b, C3dg, C3d	CUB-TED	95 nM	2.2×10^4	2×10^{-5}	na

deposition targets for opsonophagocytosis or direct destruction by initiating the lytic pathway, which triggers inflammation and formation of the membrane attack complex (MAC) [3]. The efficiency of complement activation relies on the AP amplification loop in which the C3b generated by the C3-convertase forms more AP C3-convertase and provides exponential amplification to the initial activation. In host, complement activation is strictly regulated and limited to the activator surface by a set of complement regulatory proteins in plasma and in the cellular surfaces [4].

C3 is the central protein in complement activation. It is involved in the most critical events of complement activation, which are the deposition of complement on activating surfaces and the amplification of the initial complement activation by the AP. Not surprisingly, C3 and its activated fragments are preferred therapeutic targets. Indeed, small molecules and monoclonal antibodies (mAbs) that inhibit C3 activation or block formation of the AP C3-convertase are considered the treatment of choice to prevent or ameliorate a long list of diseases in which dysregulation of the AP C3 convertase and C3 activation contributes to pathology by sustaining inflammation and perpetuating tissue damage [5–18]. In addition, because the covalent binding of C3 to complement activating surfaces is very stable, the identification of tissue-bound C3 activated fragments is routinely used as biomarker to reveal sites of complement activation.

Unfortunately, the repertoire of mAbs to C3 with potential therapeutic and diagnostic potential is limited, especially those that have been well characterized. Here we report the generation and complete functional and structural characterization of three novel mAbs that bind to C3 and block AP activation either by preventing C3 cleavage or inhibiting the assembly of the AP C3 convertase. These mAbs may offer novel therapeutic opportunities. We also describe one additional mAb that specifically recognizes iC3b, C3dg, and C3d. This last mAb reveals sites of on-going complement activation and thus could be used for targeted therapeutics or diagnostic purposes.

Results

Generation of mAbs targeting human C3, C3b, iC3b, and C3dg in mice

To generate monoclonal antibodies (mAbs) recognizing functionally relevant domains in C3 or its activated derivatives, we immu-

nized C3-deficient female C57Bl/6 mice with a mixture of human C3b, iC3b, and C3dg fragments following standard procedures. The rationale behind the use of C3-deficient mice was to avoid tolerance towards the functionally relevant regions of human C3 fragments, which are likely those most evolutionarily conserved. Hybridomas producing anti C3 mAbs were selected first based on their reactivity for C3 in ELISA, using a collection of purified proteins (C3, C3b, iC3b, C3c, and C3dg), and their capacity to inhibit AP-mediated lysis in a hemolysis assay using rabbit erythrocytes. Four clones (C3-16.4, C3-12.17, C3-42.3, and C3-12.2) were selected by these criteria (Table 1). C3-16.4, C3-12.17, and C3-42.3 recognize C3b, iC3b, and C3c and inhibit the lysis of rabbit erythrocytes in a dose-dependent way (Fig. 1A). They also completely block opsonization of the rabbit erythrocytes (Fig. 2). Importantly, the AP inhibitory mAbs achieved a 50% inhibition at approximately equimolar concentration with C3, thus strengthening the potential relevance of these mAbs as therapeutic agents. A fourth mAb C3-12.2 was selected because it specifically recognises iC3b, C3dg, and C3d.

The binding constants (KD) for C3 (C3-16.4, C3-12.17, and C3-42.3) and for iC3b (C3-12.2) were determined using Surface Plasmon Resonance (SPR; Biacore). All four mAbs showed KDs in the nM range (Table 1). We also tested the reactivity of these four mAbs in Western Blot (WB) and found that only C3-12.17 and C3-12.2 bind their targets (both, under reducing and non-reducing conditions) in this assay. C3-12.17 recognizes an epitope in the β chain (Fig. 1B and 1C) and C3-12.2 an epitope contained within C3d (see next section).

C3-12.2 specifically recognizes a neoepitope in iC3b that is preserved in C3d

C3-12.2 is the only of our four mAbs that does not recognise C3b in the ELISA assays. It binds to the α' 65 chain of iC3b and the fragments resulting from iC3b cleavage, C3dg and C3d (Table 1). C3-12.2 does not bind to C3c, confirming that it does not recognise any region within the MG ring (Fig. 1C). We also observed that C3-12.2 also binds to C3d (Fig. 3A), which narrowed down the epitope recognized by the antibody to the C-terminal region of the C3d fragment, which is exposed only after C3b is cleaved by FI to generate iC3b. To confirm this result, we incubated either iC3b or C3d with the Fab fragment generated from C3-12.2 and analyzed the complex using single-molecule electron microscopy (EM) (Fig. 3B and C). Data generated were compared with those images

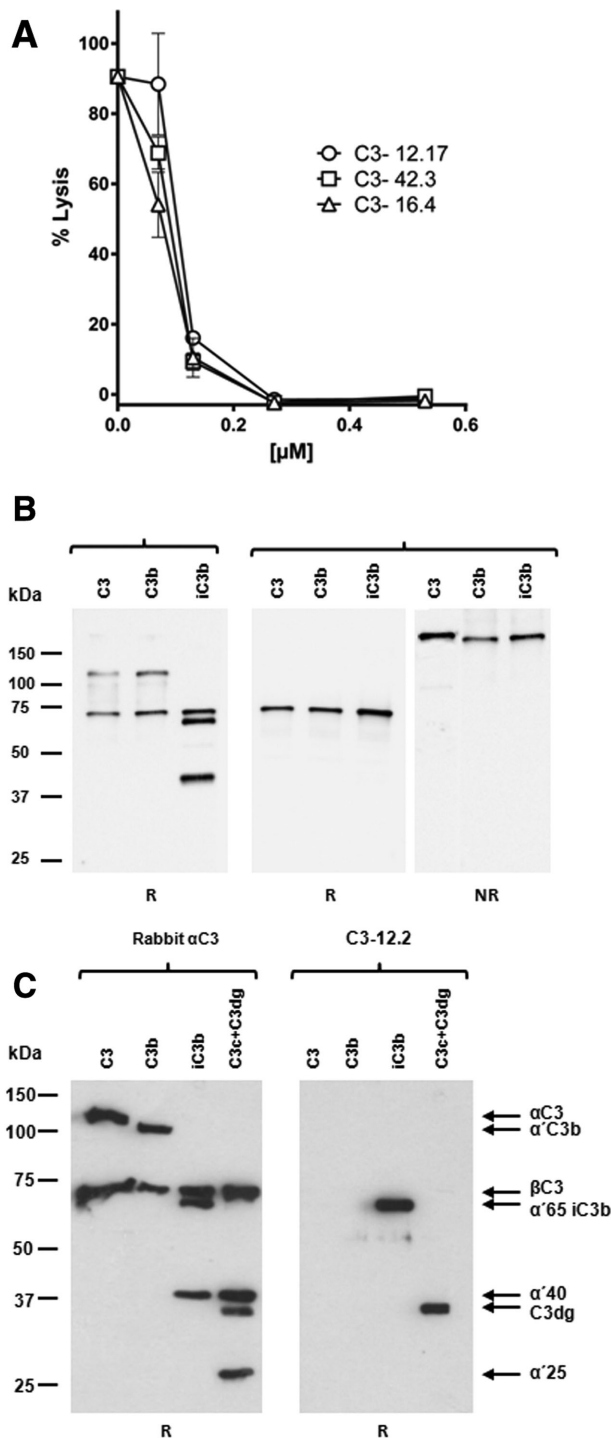


Figure 1. Screening and biochemical characterization of monoclonal antibodies. (A) Hemolytic assay using rabbit erythrocytes in the presence of NHS to determine the ability of C3-12.17, C3-42.3, and C3-16.4 to inhibit complement-mediated lysis. Data points represent mean \pm SD of triplicate samples from one representative experiment out of three. (B) Detection of C3 fragments in western blot (WB) by the mAb C3-12.17 under reducing (R) and non-reducing conditions (NR). (C) Detection of C3 fragments in WB by C3-12.2 under reducing conditions (R). (B, C) Data shown are from a single experiment representative of four experiments performed.

obtained with the individual proteins. These analyses demonstrate the formation of C3d-Fab and iC3b-Fab complexes, confirming the location of interaction site of C3-12.2 in the TED domain of iC3b (Fig. 3B and C). The conclusion reached by single-molecule EM is also consistent with our results showing that C3-12.2 does not interfere with the inactivation of iC3b to C3dg by FI in the presence of Complement Receptor 1 (CR1) (Fig. 3D).

C3-12.2 demonstrated strong binding to SDS-denatured iC3b, C3dg, and C3d by WB analysis, but no detectable binding to SDS-denatured C3 or C3b (Fig. 1C). In addition, WB analysis using purified C3dg protein and activated plasma from human, mouse and rat also illustrated that the epitope recognized by mAb C3-12.2 is evolutionarily-conserved (Fig. 3E).

C3-12.17 and C3-42.3 inhibit the AP by blocking the interaction of C3 with the AP C3-convertase

C3-12.17 and C3-42.3 efficiently block AP-mediated opsonization and hemolysis of rabbit erythrocytes in the presence of normal human serum (Figs. 1A and 2). To determine at which level these mAbs inhibit the activation of the AP we performed in vitro experiments using purified C3, C3b, FB, and FD. In these experiments, C3, C3b and an equimolar mixture of C3 and C3b were incubated with FB and FD at 37°C for 15 min and the resulting activated fragments analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions (Fig. 4). In the absence of inhibitory antibodies both, C3 and FB, are completely consumed, which is illustrated by the disappearance of the C3 α -chain and FB 90kDa bands and the generation of the C3 α' -chain and the Bb 60 kDa (Fig. 4). As expected, in the presence of C3-12.17 and C3-42.3 there was no activation of C3. However, FB was completely consumed, indicating that these two mAbs block activation of C3 but do not interfere the formation of the AP C3-convertase (Fig. 4). Thus, in the presence of C3-12.17 and C3-42.3, FB can bind C3b (or C3H2O) and FB is then efficiently cleaved by FD to the Bb and Ba fragments. Our interpretation was that C3-12.17 and C3-42.3 bind to the same region (or to two separate regions) in C3 and C3b that do not affect the binding of FB, but impair the interaction of the C3 with the AP C3-convertase, blocking the cleavage of the C3. Alternatively, these mAbs could block accessibility to the cleavage site in C3 by the catalytic site of the AP C3-convertase located in the Bb fragment.

Structural basis of the AP inhibition by C3-12.17 and C3-42.3

To understand the molecular basis of the inhibition of C3 activation by C3-12.17 and C3-42.3, we mapped the interaction site of C3-12.17 and C3-42.3 in C3 by resolving the 3D structure of the corresponding C3b-Fab complexes using single-molecule EM (Fig. 5). The Fab fragments from each of the two mAbs were generated following standard procedures and a molar excess of each Fab was then incubated with C3b. The C3b-Fab complexes were

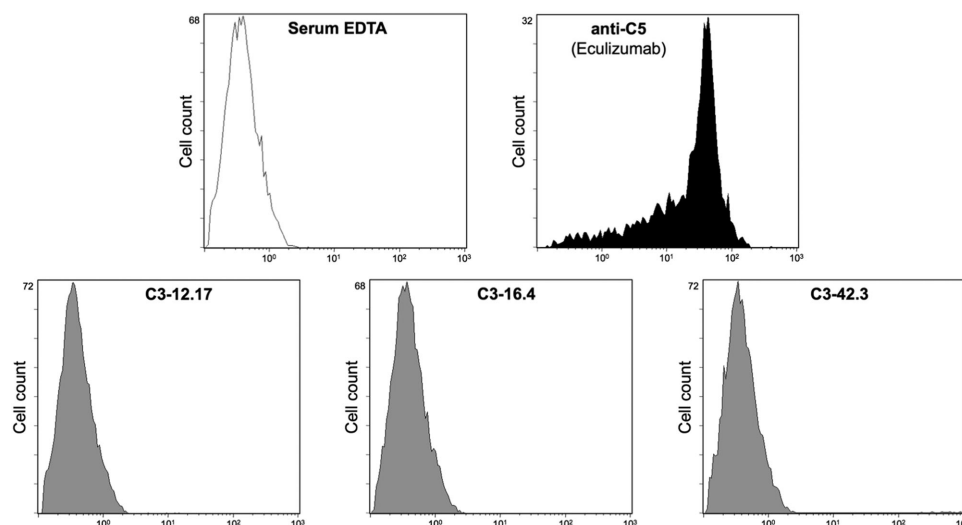


Figure 2. The mAbs C3-12.17, C3-16.4 and C3-42.3 inhibit C3 opsonization of rabbit erythrocytes. Rabbit erythrocytes were incubated with NHS and excess of the three different mAbs (C3-12.17, C3-16.4, and C3-42.3) and Eculizumab. NHS with EDTA was used as a negative control. Flow cytometry analysis using a rabbit polyclonal anti-C3 Ab was performed to detect the presence of C3 fragments. This experiment was performed in triplicate with identical results.

separated from the single components by size exclusion chromatography. Elution fractions from these gel filtration experiments were analyzed by SDS-PAGE to confirm the presence of the C3b–Fab complexes (Fig. 5A). The peak fraction containing the C3b–Fab complexes for each mAb was then analyzed using single-molecule EM. To this end, several thousand images of sin-

gle molecules of the immune-complexes were extracted from the micrographs. 2D classification and image processing was used to calculate 2D averages with improved signal to noise ratio corresponding to several views of the complex, depending on the orientation of the molecules on the support film used for EM. Averages clearly revealed the presence of a Fab fragment bound to the MG

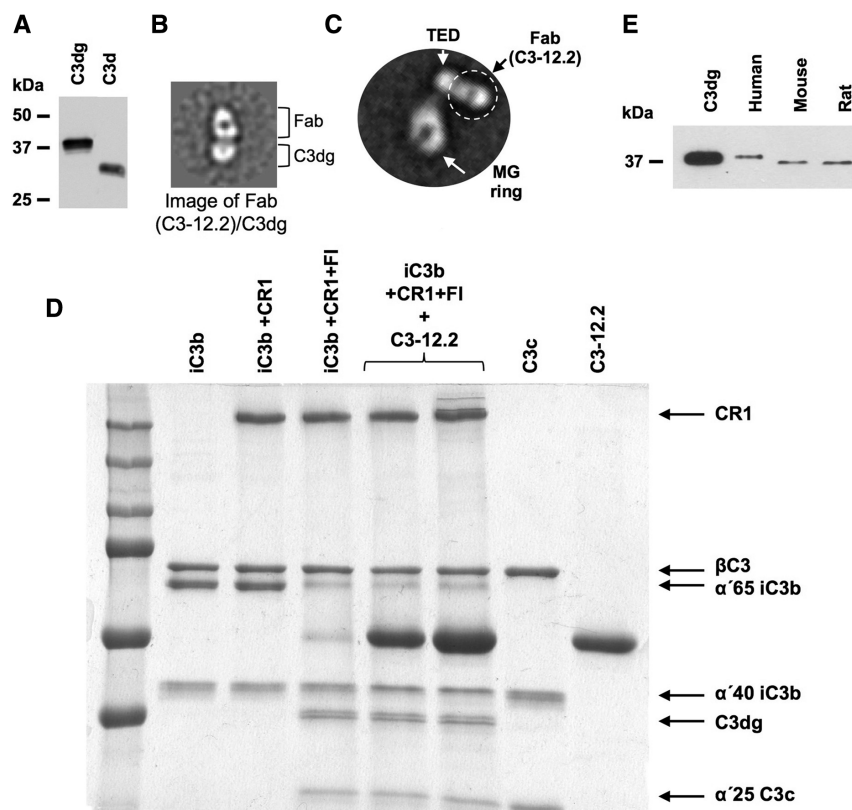


Figure 3. C3-12.2 recognizes an epitope in C3d exposed after cleavage of C3b to iC3b. (A) WB performed using purified proteins showing that C3-12.2 binds to the C3d epitope. (B) Electron microscopy average image of a Fab generated from C3-12.2 and its immune complex with C3d. The figure shows a representative 2D average of the Fab/C3d complex obtained after image processing of images obtained in the electron microscope. (C) Representative 2D average of the immune complex between C3-12.2 and iC3b. The position of the distinct domains was determined by comparison with previous EM structures from our group, and they are indicated. (D) C3-12.2 does not affect iC3b inactivation to C3dg in presence of CR1 and FI. Coomassie Blue staining of an in vitro reaction where iC3b was previously incubated with the C3-12.2 for 10' at 37°C, and then, the CR1 and FI were added for another 60' of incubation. The inactivation of iC3b is illustrated by the disappearance of the α' 65 band and the generation of the C3dg band. (E) C3-12.2 recognizes the C3dg fragment in the activated plasma of human, mouse and rat, indicating that this mAb binds an evolutionary-conserved epitope in the C3dg molecule. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

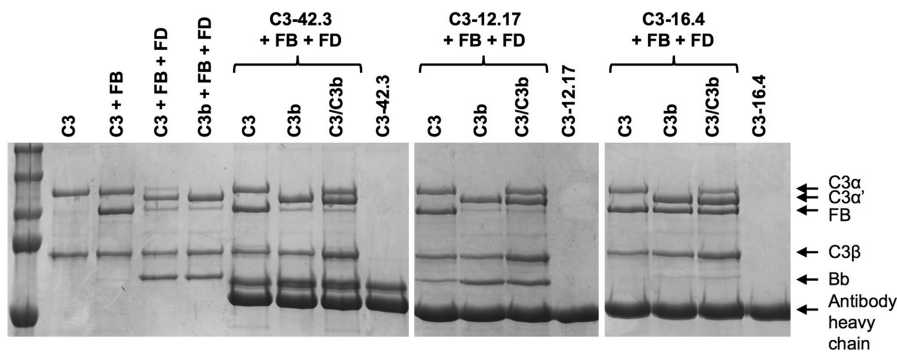


Figure 4. Functional effects of C3-12.17, C3-42.3, and C3-16.4 in C3 activation *in vitro*. In the presence of C3-12.17 and C3-42.3 there is no activation of C3, but FB is completely consumed. C3-16.4 blocks the activation of C3b and FB remains intact, suggesting that the mAb interferes with the assembly of the AP C3-convertase. All reactions were analyzed by Coomassie Blue staining. C3b was previously incubated with the different mAbs for 10' at 37°C, and then, the FB and FD were added for another 45' of incubation. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

ring of C3b, but the positioning of the Fab was different for the C3-12.17 and C3-42.3 mAbs (Fig. 5B).

The precise location of the Fab in the each of the C3b–Fab complexes was defined more precisely by resolving the 3D structure of

the complexes at 30 Å resolution using the single molecule images of the immune complexes as input for 3D refinement (Fig. 5C). The 3D structures were interpreted after fitting and combining the atomic structures of the MG ring from C3b, and a structure

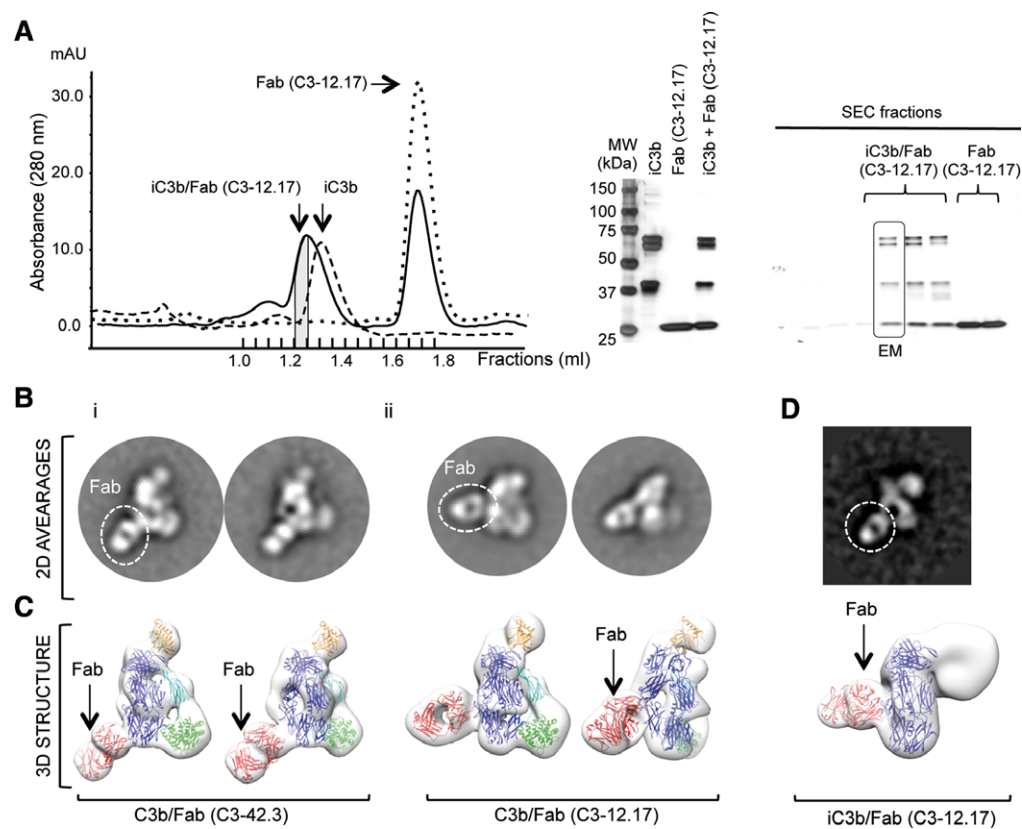


Figure 5. Purification and structure of immune-complexes for C3-42.3 and C3-12.17. (A) Fabs for each of these mAbs were incubated in molar excess with C3b or iC3b and the mixture was resolved by size-exclusion chromatography (SEC) (left panel). Figure shows only the chromatogram for the incubation of iC3b and Fab (C3-12.17) as a representative example. As control, each protein and Fab was also subjected to a SEC experiment before mixing. The immune complexes eluted first in the gel filtration column (continuous line) compared to C3b/iC3b (dashed line) and the Fab (dotted line). Fractions were analyzed by SDS-PAGE (right panel), and the peak fraction for the mixture containing both C3b/iC3b and the Fab was selected for structural analysis by electron microscopy (EM). This fraction is labeled in gray color in the chromatogram. (B) Representative 2D averages obtained after averaging several hundreds of images of complexes containing C3b and C3-42.3 (i) or C3-12.17 (ii), obtained in the electron microscope. The location of the Fab is indicated with a dashed white circle. (C) Two different views of the medium-resolution structure of the C3b/Fab complexes shown as a white transparent density. The structures were interpreted after fitting the crystal structures of C3b (PDB 2I07) [37] and a representative structure of a Fab. The MG ring is coloured in blue, TED domain in green, C345C in orange, and the Fab in red. (D) One representative average (top panel), and 3D structure (bottom panel) of Fab (C3-12.17) bound to iC3b. The location of the Fab is indicated within a dashed circle. In the structure, iC3b appears as in the conformation described in Alcorlo et al [38], and only the atomic structure of the MG ring and a Fab was fitted.

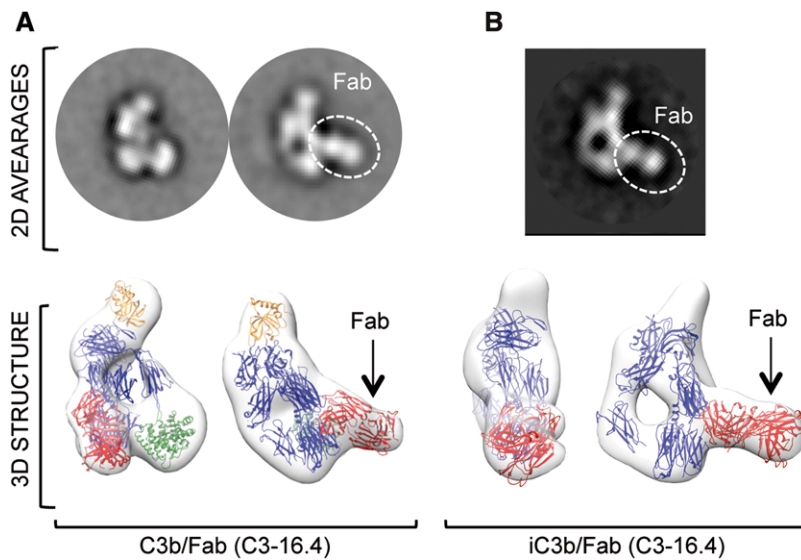


Figure 6. Structure of immune-complexes for C3-16.4. (A) Representative 2D averages obtained after averaging several hundreds of electron microscope images of complexes containing C3b and C3-16.4 (top). The location of the Fab is indicated with a dashed white circle. Two view of the medium-resolution structure of the C3b/Fab complex shown as a white transparent density (bottom). The structures were interpreted after fitting the crystal structures of C3b (PDB 2I07) [37] and a representative structure of a Fab. Color-coding as in Fig. 6. (B) One representative average (top), and 3D structure (bottom) of Fab (C3-16.4) bound to iC3b. The location of the Fab is indicated within a dashed circle. In the structure of iC3b, the TED domain is displaced in several positions on the EM images, and thus, its density is not observable after 2D and 3D averaging, as described before [39].

of a representative Fab, into the EM density, following standard methods used previously in our laboratory. As anticipated, the 3D structures revealed that C3-12.17 and C3-42.3 recognized two distinct positions of the MG ring. In both cases, the Fab fragment of the mAb projected from the MG outwards. Our models indicated that C3-12.17 recognizes a region around domains MG3 and MG4, whereas C3-42.3 binds to a region in the proximity of domains MG4 and MG5. These interaction sites are consistent with the binding specificity of C3-12.17 and C3-42.3 for C3b, iC3b, and C3c fragment, since all of these fragments contain the targeted epitopes in the MG ring (Table 1). Using similar methods, we analyzed the interaction of C3-12.17 with iC3b, finding, as expected, that C3-12.17 recognizes the same region in iC3b previously identified using C3b (Fig. 5D). As a whole, the resolution of the 3D structures of these C3b-Fab complexes explains how C3-12.17 and C3-42.3 block activation of C3 without affecting the assembly of the AP C3-convertase. These regions are distant from both the interaction site of FB and the cleavage site by the AP C3-convertase, demonstrating that C3-12.17 and C3-42.3 inhibit C3 activation by binding to a region of C3 and C3b that has been postulated to be involved in the recognition of the C3 substrate by the C3bBb AP C3-convertase [19–21].

C3-16.4 inhibits the AP by preventing the formation of the C3bBb C3-convertase

In contrast to C3-12.17 and C3-42.3 that inhibit C3 activation, but not the formation of the AP C3 convertase, C3-16.4 blocks the formation of the AP C3-convertase. In vitro experiments using purified C3, C3b, FB, and FD show that when these proteins are incubated together in the presence of C3-16.4 neither C3 and FB are consumed (Fig. 4). The inhibition of FB cleavage into Bb and Ba is particularly illustrative when C3b, FB, and FD are incubated together, as this indicates that C3-16.4 blocks formation of the AP C3-convertase (Fig. 4). Our conclusion from these data was that C3-16.4 inhibits AP activation by blocking the interaction of FB with C3b (or C3H20) and, therefore, the formation of the AP C3 convertase.

Structural basis of the AP inhibition by C3-16.4

Using a similar approach to that described before to map the binding site of C3-12.17 and C3-42.3 in C3, we have solved the 3D structure of the complexes formed between C3b (or iC3b)

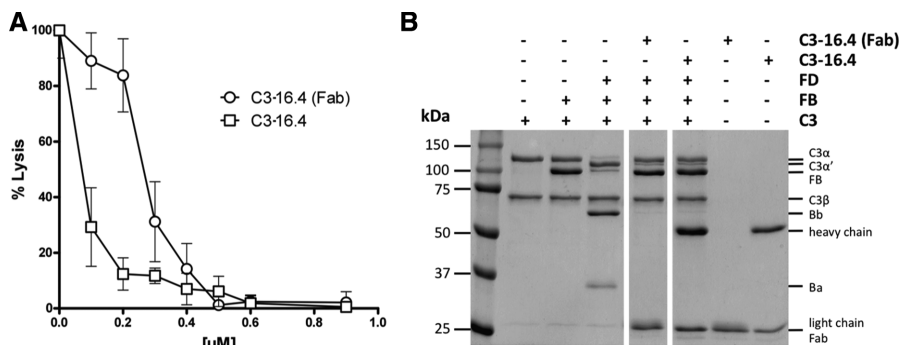


Figure 7. The C3-16.4 Fab fragment blocks the AP C3-convertase formation and prevents the complement mediated lysis of rabbit erythrocytes in presence of NHS. (A) Rabbit erythrocytes were incubated with NHS and increasing concentration of the C3-16.4 Ab or its Fab fragment. Data points represent mean \pm SD of triplicate samples from one representative experiment out of three. (B) Coomassie-gel blue staining using purified proteins shows that the presence of either full C3-16.4 mAb or its Fab fragment prevent the cleavage of C3 or FB by the AP C3-convertase. Data shown are from a single experiment representative of three independent experiments.

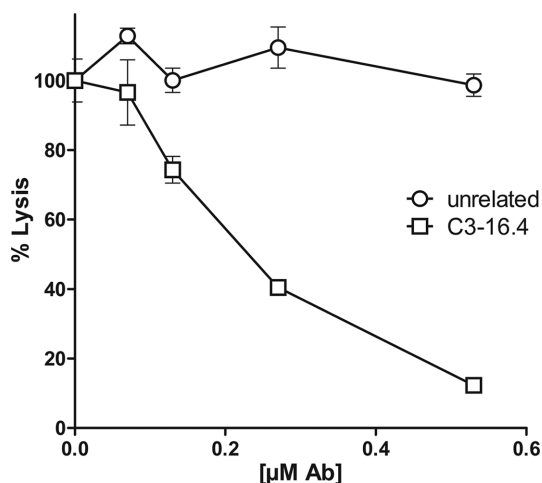


Figure 8. The C3-16.4 inhibits complement mediated lysis of rabbit erythrocytes in presence of mouse serum. Rabbit erythrocytes were incubated with 20% mouse serum and increasing concentration of the C3-16.4 mAb. Data points represent mean \pm SD of triplicate samples from one representative experiment out of two.

with the Fab fragment of C3-16.4 (Fig. 6A and B). These data demonstrate that the C3-16.4 Fab recognizes a region around MG2 and MG6, and projects outward the C3b molecule. The region of C3 mapped by C3-16.4 is proximal, although not identical, to that mapped by H17, a humanized antibody that blocks FB binding to C3 and convertase formation [22]. C3-16.4 Fab sits proximal but not overlapping to regions in C3b involved in binding FB according to the structure of C3bB [23] (PDB 2XWJ). Thus, the effect of C3-16.4 on convertase formation must be indirect. A possibility could be that C3-16.4 alters the conformation of C3b in features essential for the binding to FB.

We were intrigued to know whether the inhibitory capacity of C3-16.4 is maintained in its Fab fragment or it is just a consequence of the large steric obstruction caused by the binding to C3b of the full antibody. Figure 7A illustrates that both full C3-16.4 and its Fab fragment efficiently inhibit the lysis of rabbit erythrocytes; the observed differences in the hemolytic assay likely being a consequence of the avidity effects on the surface of the rabbit erythrocytes. Using purified complement components

we also show that both full C3-16.4 and its Fab fragment inhibit formation of the AP C3-convertase, blocking activation of FB and C3 (Fig. 7B).

C3-16.4 recognizes mouse C3 and efficiently blocks AP activation in mouse serum

Elisa assays using mouse serum demonstrated that C3-16.4, but not C3-12.17 and C3-42.3, recognizes mouse C3 and prevents the lysis of rabbit erythrocytes by mouse serum in a dose-dependent manner, achieving 50% blockage at equimolar C3:mAb concentrations (IC_{50} : 0.23 μ M; [C3]: 0.3 μ M) (Fig. 8). Binding constant (K_D) of C3-16.4 for mouse C3 was calculated using SPR as $K_D = 6.8 \cdot 10^{-8}$ (M), with $K_a = 4.7 \cdot 10^4$ (1/Ms) and $K_d = 3.2 \cdot 10^{-4}$ (1/s) (Fig. 9). The K_D value for mouse C3 is significantly different from that observed for human C3, which is basically due to the fact that C3-16.4 dissociates from mouse C3 very fast.

C3-12.17, C3-42.3, and C3-16.4 block complement-mediated lysis of sheep erythrocytes in vitro

Atypical haemolytic uremic syndrome (aHUS) is characterized by impaired protection of endothelial cells from complement-mediated damage. In a significant numbers of aHUS patients, this impaired protection is a consequence of pathogenic variants in the complement factor H protein [24]. Complement dysregulation in aHUS sera can be demonstrated with a hemolytic assay using sheep erythrocytes [25]. Using an aHUS-like positive sera, consisting in a normal human serum depleted of 75% of its FH, we demonstrated that in this in vitro aHUS model the mAbs C3-12.17, C3-42.3 and C3-16.4 inhibit the lysis of the sheep erythrocytes in a concentration dependent fashion. Total inhibition of the lysis was achieved in all cases at concentration of the mAb that was essentially equimolar with that of serum C3 ([mAb]: 0.7 μ M; [C3]: 0.83 μ M) (Fig. 10).

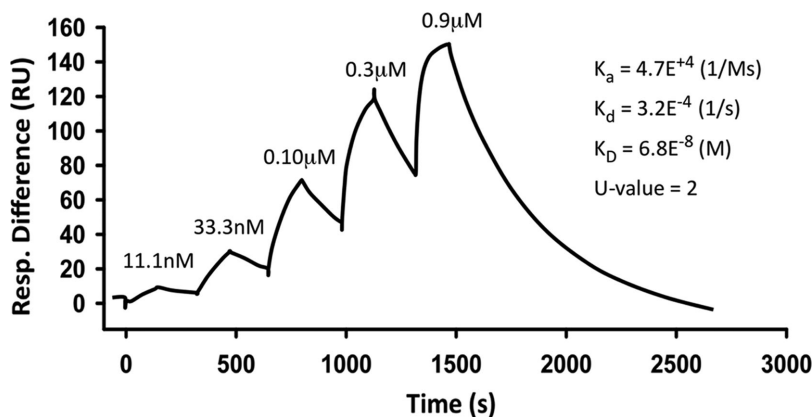


Figure 9. SPR analysis of binding of C3-16.4 mAb to mouse C3. The C3-16.4 mAb was captured using an anti-mouse IgG Ab surface and five increasing concentrations of mouse C3 were flowed over it. Data were fitted using 1:1 binding model. The resultant constants are shown at the right part of the panel. Data are from a single experiment with five samples.

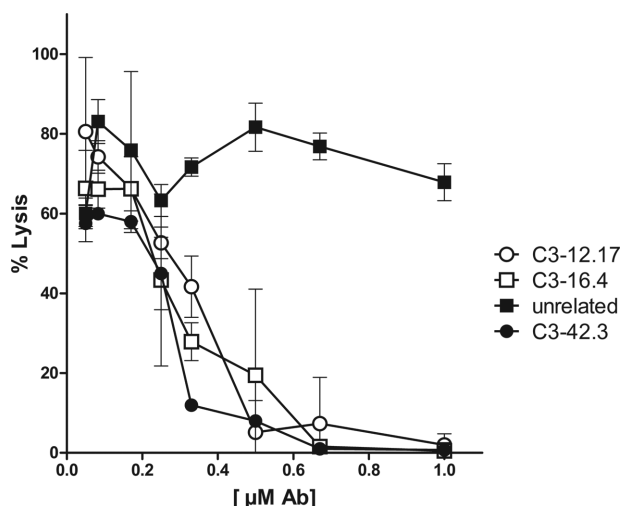


Figure 10. C3-12.17, C3-42.3 and C3-16.4 block the lysis of sheep erythrocytes in an *in vitro* aHUS model. Sheep erythrocytes were incubated in presence of 15% aHUS-like serum and increasing concentration of the mAbs (from 0.05 to 1 μ M). An unrelated mAb was used as control. Data points represent mean \pm SD of triplicate samples from one representative experiment out of three.

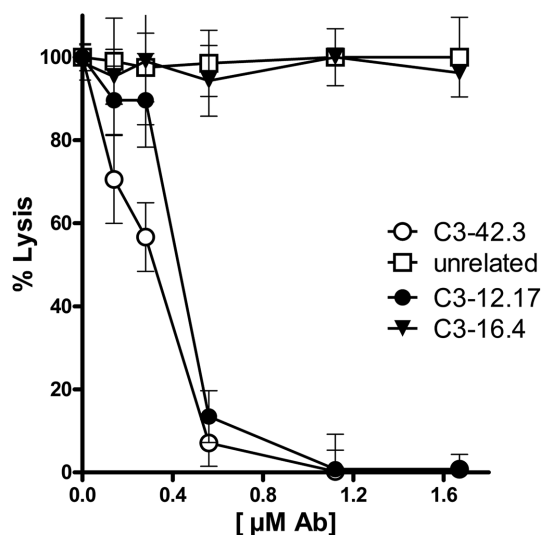


Figure 11. C3-12.17 and C3-42.3 efficiently prevent the lysis of PNH erythrocytes in acidified serum. Ham test with PNH erythrocytes was performed in the presence of increasing concentrations of the three mAbs. An unrelated mAb was used as a control. Data points represent mean \pm SD triplicate samples from one representative experiment out of three.

C3-12.17 and C3-42.3 prevents lysis of PNH erythrocytes in acidified human serum

Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare complement-mediated hemolytic anemia characterized by the generation of erythrocytes lacking all GPI-anchored proteins, including the complement regulators CD55 and CD59, which are consequently susceptible to complement-mediated lysis [26]. The

Ham test, a classical PNH assay [27], involves exposing the PNH erythrocytes to NHS acidified to pH 6.4 to initiate activation of the AP. We have performed the Ham test with PNH erythrocytes from an eculizumab-treated patient that are heavily opsonised with C3 fragments and demonstrate that addition of C3-12.17 and C3-42.3 efficiently block their lysis in a concentration-dependent fashion (Fig. 11). Total inhibition of the lysis in both cases was achieved at concentration of the mAbs that was essentially equimolar with that of C3 ([mAbs]: 0.92 μ M; [C3]: 0.92 μ M). Notably, the C3-16.4 fails to protect the lysis of C3-opsonized PNH erythrocytes, suggesting that this mAb does not prevent the formation of the AP C3-convertase when C3b is deposited on the cell surface. To test this possibility, we performed a haemolytic assay using rabbit erythrocytes that were heavy opsonized by incubating them with human serum in the presence of eculizumab.

The data replicate the results with the opsonized PNH erythrocytes showing that the mAb C3-16.4 does not protect the opsonized erythrocytes from lysis, whereas the mAb C3-12.17 does. These results support our conclusion that the mAb C3-16.4 does not block the AP C3-convertase formation when C3b is deposited on the cell surfaces.

Discussion

Monoclonal antibodies (mAbs) against C3 and its activated fragments have many biomedical applications. They can be used to modulate the biological functions of C3, to target activated C3 fragments as *in vivo* delivery vehicles for new therapeutics or can be used as diagnostic agents to reveal sites of on-going complement activation [28]. These reagents are, however, scarce. We report here a detailed functional and structural characterization of four monoclonal antibodies (mAbs), generated by immunizing C3-deficient mice with a mixture of human C3b, iC3b, and C3dg fragments, which have these diagnostic and therapeutic potentialities. Three of these mAbs very efficiently inhibit activation of the AP. mAbs C3-12.17 and C3-42.3 bind to C3 and C3b with KDs in nM range (Table 1 and Figs. 1 and 2, and 4), which result in an almost irreversible binding to the target molecule at equimolar concentrations. WB analysis (Fig. 1) and 3D modeling using EM (Fig. 6) demonstrated that they recognize two distinct epitopes, both conserved in the C3/C3b/iC3b molecules, located close to each other within a region that have been postulated critical for the recognition of the C3 substrate by the AP C3 convertase (C3bBb) [19–21]. Binding of these mAbs to C3, or to C3b in the C3bBb convertase, efficiently blocks C3 activation (Figs. 1 and 2) and inhibits completely AP activation (Fig. 4). Our data also show that these mAbs do not interfere with the assembly of a C3bBb convertase (Fig. 4). In contrast, C3-16.4 and its Fab fragment bind to an epitope in a region of C3 around MG2-MG6 and impede the formation of the AP C3 proconvertase (C3bB) (Figs. 4 and 6).

C3-12.17, C3-42.3, and C3-16.4 are, therefore, new mAbs that can be added to the list of molecules able to block formation and/or activity of the AP C3-convertase and that, upon humanization could be used to down-modulate the AP in the long

list of diseases in which AP activation contributes to pathology. To provide proof of concept of the usefulness of the mAbs to prevent or ameliorate the consequences of complement activation in diseases characterized by AP complement dysregulation, we have used them successfully in an *in vitro* aHUS model with sheep erythrocytes (Fig. 10) and an *ex vivo* model using erythrocytes from PNH patients who are treated with eculizumab (Fig. 11). Eculizumab treatment has improved significantly the quality of life of PNH patients. However, because eculizumab does not block the activity of the AP C3 convertase, C3 opsonization of PNH erythrocytes persists, resulting in variable percentages of erythrocytes covered by C3 fragments, which are susceptible to extracellular hemolysis [29–31]. Using PNH erythrocytes obtained from patients treated with eculizumab, we were able to show that C3-12.17 and C3-42.3 efficiently prevented their lysis in the presence of acidified human serum (Fig. 11).

C3-12.17, C3-42.3, and C3-16.4 are distinct mAbs, targeting different epitopes in C3. Although these mAbs very efficiently inhibit the AP activity in human serum, the potential advantages of one of these mAbs over the others will require direct comparisons using *in vivo* models of disease, which we have not been able to address. C3-16.4 is the only of the three mAbs that recognizes both human and mouse C3. However, whilst binding of C3-16.4 to human C3 results in an almost irreversible binding, the binding of C3-16.4 to mouse C3 present a very high dissociation constant ($K_d = 3.2 \cdot 10^{-4}$ (1/s)). This has prevented us from exploring the capacity of C3-16.4 to inhibit mouse complement *in vivo* in disease models generated in this species.

The structure/function correlations generated with the mAbs C3-12.17, C3-42.3 and C3-16.4 are also important because they provide additional support to the currently accepted 3D models that explain the assembly of the C3bBb convertase and the recognition of C3 by the C3bBb convertase. The attachment between two MG rings revealed by crystal structures of a dimeric convertase complex [21] and the crystal structure of cobra venom factor in complex with C5 [19] have been used to hypothesize how a convertase recognizes its substrate, C3. A mutation proximal to the proposed point of attachment between the convertase and C3 blocks substrate recognition by the convertase, supporting this model [20]. Our structural and functional analysis of mAbs C3-12.17 and C3-42.3 further strengthens this model. Both antibodies bind to the MG ring at a region that would prevent the formation of C3/C3b heterodimers, and as predicted by the current model, both mAbs do not block convertase formation but C3 cleavage to C3b is affected. On the other hand, C3-16.4 maps a region adjacent to that recognized by H17, a humanized antibody that blocks FB binding to C3b [22]. C3-16.4 interferes with the assembly of a convertase and the structural analysis suggests that these effects must be indirect, since the antibody does not bind to a region involved in the interaction with FB. A possibility could be that C3-16.4 modifies the conformation of C3b in aspects that are essential for the binding to FB.

In addition to the three antibodies that inhibit the AP activation, we report the generation and characterization of a fourth mAb C3-12.2 that specifically recognizes iC3b, C3dg, and C3d in

human and several other species. This mAb can be used to target these activated C3 fragments in fluid phase or tissue-bound, which has both diagnostic and therapeutic importance. mAbs that recognize efficiently iC3b from different species are scarce and highly valuable because of their potential applications in clinical and basic research. C3-12.2, for example, was probed to be useful in detecting human and mouse iC3b/C3dg deposition over opsonized surfaces by flow cytometry and immunohistochemistry (data not shown), extending the small repertoire of mAbs that can be used to monitor complement activation [28]. Furthermore, C3-12.2 has also been successfully used in our laboratory to develop a specific ELISA to measure iC3b and to purify mouse C3dg to homogeneity from activated whole mouse serum using a single affinity chromatography step (data not shown).

In conclusion, mAbs targeting complement proteins are a continuous source of valuable reagents for the developing of therapeutic and diagnostic tools. They also provide insightful information to study structural functional relationships in complement activation and regulation. Despite the existence of other anti-complement mAbs, those that are well characterized in their functional and structural properties are not that common. In this respect, our four novel mAbs against human C3, added to those previously reported by Thurman *et al.* [28], offer a repertoire of novel reagents binding to functional regions or unique neo-epitopes in C3, with relevant diagnostic and therapeutic potentialities.

Materials and methods

Generation of monoclonal antibodies

C3-deficient mice were immunized with 20 μ g of a mixture of the human activated C3 fragments, C3b, iC3b, and C3dg, emulsified in complete Freund's adjuvant. Subsequently, mice were boosted three times at 2-week intervals with the same amount of C3 fragments in incomplete adjuvant. The mice were screened for the development of antibodies to C3 by testing their sera in an ELISA using plates coated with equimolar amounts of the human C3 activated fragments. Positive mice were given an additional boost. Three days later spleen cells from a mouse having a robust immune response toward C3 were fused to the X63AG8 myeloma cell line. Candidate hybridomas were cloned by limiting dilution, and clones recognizing human activated C3 fragments were selected for further growing. mAbs from these hybridoma clones were purified from the supernatants by affinity chromatography using a protein-G sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The purity of the mAbs was then analyzed by 10 % SDS-PAGE and their immunoglobulin isotype determined with the IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Applied Science). All animal experimentation has been reviewed and approved by the CSIC Institutional Review Board (SAF2015-66287-R).

Isolation of complement components

C3 was purified from plasma EDTA using an established protocol [32]. C3b was generated by C3-convertase cleavage. iC3b was produced by incubation of C3b in presence of FH and FI in Hepes 10 mM, NaCl 150 mM, whereas C3dg was produced by incubation of C3b with FH and FI at low ionic strength. iC3b and C3dg were purified by anion exchange and size exclusion chromatography. FD was purchased from Calbiochem. Concentrations of pure C3 and C3 activated fragments were assessed using absorbance at A280 and a extinction coefficients of $0.98 \text{ cm}^{-1} (\text{mg/mL})^{-1}$.

ELISAs

To characterize the reactivity of the antibodies against the different C3 fragments we performed a direct ELISA coating the plates with purified human C3, C3b, iC3b and C3dg or mouse C3 at $1 \mu\text{g/mL}$ ON at 4°C in PBS pH 7.4. After blocking with BSA, increasing amounts of the antibodies were added (0.5 to $2 \mu\text{g/mL}$) and detected with a HRP-conjugated anti-mouse IgG ($1:1000$).

Inhibition of C3 cleavage assay

To test the ability of the mAbs to inhibit C3 cleavage we used an in vitro assay using purified C3 ($1 \mu\text{g}$), FB ($1 \mu\text{g}$) and FD (5 ng) components in 25 uL of AP buffer (2.9 mM barbital, 1.7 mM sodium barbital, 144 mM NaCl, 7 mM MgCl_2 , 10 mM EGTA, pH 7.4). The C3 was first incubated in presence of $2 \mu\text{g}$ and $4 \mu\text{g}$ of each mAb for 10 min at 37°C in a water bath. Then, the FB was added and 10 min later FD, allowing the reaction to proceed for 40 min longer. Cleavage of C3 was assessed in 10% SDS-PAGE under reducing conditions and Coomassie blue staining.

Hemolytic assays

The capacity of the mAbs to prevent the activation of AP on cellular surfaces was assessed with the classical AP hemolytic assay using rabbit erythrocytes as previously described [33], and the hemolytic assay using sheep erythrocytes to test sera from atypical uremic syndrome (aHUS) patients [25]. For this assay, we used an aHUS-like serum consisting of a normal human serum that has been depleted of 75% of the FH. For the haemolytic assay using mouse serum, the mouse serum concentration was 20% .

Rabbit erythrocytes were also used to test the capacity of the mAbs to prevent C3 deposition on cell surfaces. Briefly, $100 \mu\text{L}$ of rabbit erythrocytes ($1 \times 10^8/\text{mL}$) in AP buffer were incubated with 5% NHS in presence of either Eculizumab (Soliris®, Alexion Pharmaceuticals) or the different mAbs against C3 at 37°C for 30 min . C3 deposition was evaluated by flow cytometry using a rabbit polyclonal anti human C3 antibody (in house; $1 \mu\text{g/mL}$ in PBS).

To test the capacity of the mAbs to inhibit acidified lysis of PNH erythrocytes (the Ham test) [27], we incubated at 37°C for

1 h PNH erythrocytes (4% v:v final) with 25% NHS in AP buffer acidified by addition of 9% of HCl 0.2 M , in the presence of increasing amounts of the mAbs. Hemolysis in supernatants was read at 540 nm and the percentage of lysis calculated using zero and 100% lysis controls.

Generation of Fabs from purified mAbs

Fabs were produced using Pierce® Mouse IgG₁ Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (Thermo Scientific) according to the instructions provided by the manufacturer. The Fabs were purified using size-exclusion chromatography and a Superdex 200 (GE Healthcare) in 20 mM Tris, 60 mM , 1% EDTA-free protease inhibitor (Roche). The peak fractions were concentrated using Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Millipore) and analyzed by SDS-PAGE to verify the presence of the Fab.

Determination of binding constants (KD) by surface plasmon resonance (SPR)

All SPR analyses were carried out on a Biacore X100 (GE Healthcare). For the determination of binding constants (KD) of the mAbs we used a single-cycle-kinetics method. This approach consisted of five consecutive injections of C3b or mouse C3 (analyte) at increasing concentrations, over a surface in which the mAbs were captured using an anti-mouse antibody as described previously [33]. Each injection lasted for 150 s separated by a dissociation period of 180 s , during which C3-free buffer was injected. The cycle was completed with an extended dissociation period of 3900 s and a regeneration step to release both the anti-C3 mAbs and C3.

Electron microscopy and 3D reconstruction of immune complexes

Immune complexes were prepared by mixing a 1.5 to 3.0 molar excess of Fab with C3b or iC3b, incubated for 30 min at 37°C and then diluted and adsorbed on carbon-coated grids for negative staining with 1% uranyl formate. Imaging was performed in a JEOL-1230 100 kV and data automatically acquired with a TVIPS F416 CMOS at 54926 of final magnification. Automated particle selection as implemented in EMAN2 [34] was used to select $>15\,000$ particles per experiment and then classified and averaged in XMIPP [34]. Initial models were generated in EMAN2 or created directly from a C3b atomic structure (PDB 2I07). 3D structures were refined in XMIPP [35] reaching an estimated resolution of $29\text{--}30 \text{ \AA}$ in all cases following the FSC 0.5 criteria. Fitting of atomic structures was performed using UCSF Chimera [36]. In the case of the complexes between C3-12.2 and iC3b a similar strategy was followed, but the heterogeneity of the C3d domain location limited the analysis to 2D classification and averaging.

Acknowledgements: Work in this report has been funded by the Spanish “Ministerio de Economía y Competitividad” (SAF2011-26583 and SAF2015-66287-R to SRdC and SAF2014-52301-R to OL) and the Seventh Framework Programme European Union Project EUREnOmics (305608) to SRdC. In addition, this work has been supported by a grant from the Autonomous Region of Madrid (S2010/BMD-2316) to SRdC and OL.

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- Walport, M. J., Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 2001. **344**: 1058–1066.
- Walport, M. J., Complement. Second of two parts. *N. Engl. J. Med.* 2001. **344**: 1140–1144.
- Morgan, B. P., Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit. Rev. Immunol.* 1999. **19**: 173–198.
- Lachmann, P. J., The amplification loop of the complement pathways. *Adv. Immunol.* 2009. **104**: 115–149.
- Holers, V. M. and Thurman, J. M., The alternative pathway of complement in disease: opportunities for therapeutic targeting. *Mol. Immunol.* 2004. **41**: 147–152.
- Thurman, J. M., Kraus, D. M., Girardi, G., Hourcade, D., Kang, H. J., Royer, P. A., Mitchell, L. M. et al., A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol. Immunol.* 2005. **42**: 87–97.
- DiLillo, D. J., Pawluczakowycz, A. W., Peng, W., Kennedy, A. D., Beum, P. V., Lindorfer, M. A. and Taylor, R. P., Selective and efficient inhibition of the alternative pathway of complement by a mAb that recognizes C3b/iC3b. *Mol. Immunol.* 2006. **43**: 1010–1019.
- Leinhase, I., Rozanski, M., Harhausen, D., Thurman, J. M., Schmidt, O. I., Hossini, A. M., Taha, M. E. et al., Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice. *J. Neuroinflammation* 2007. **4**: 13.
- Katschke, K. J., Jr., Stawicki, S., Yin, J., Steffek, M., Xi, H., Sturgeon, L., Hass, P. E. et al., Structural and functional analysis of a C3b-specific antibody that selectively inhibits the alternative pathway of complement. *J. Biol. Chem.* 2009. **284**: 10473–10479.
- Lindorfer, M. A., Pawluczakowycz, A. W., Peek, E. M., Hickman, K., Taylor, R. P. and Parker, C. J., A novel approach to preventing the hemolysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: both complement-mediated cytolysis and C3 deposition are blocked by a monoclonal antibody specific for the alternative pathway of complement. *Blood* 2010. **115**: 2283–2291.
- Risitano, A. M., Notaro, R., Pascariello, C., Sica, M., del Vecchio, L., Horvath, C. J., Fridkis-Hareli, M. et al., The complement receptor 2/factor H fusion protein TT30 protects paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes from complement-mediated hemolysis and C3 fragment. *Blood* 2012. **119**: 6307–6316.
- Katschke, K. J., Jr., Wu, P., Ganesan, R., Kelley, R. F., Mathieu, M. A., Hass, P. E., Murray, J. et al., Inhibiting alternative pathway complement activation by targeting the factor D exosite. *J. Biol. Chem.* 2012. **287**: 12886–12892.
- Zhang, Y., Nester, C. M., Holanda, D. G., Marsh, H. C., Hammond, R. A., Thomas, L. J., Meyer, N. C. et al., Soluble CR1 therapy improves complement regulation in C3 glomerulopathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013. **24**: 1820–1829.
- Risitano, A. M., Ricklin, D., Huang, Y., Reis, E. S., Chen, H., Ricci, P., Lin, Z. et al., Peptide inhibitors of C3 activation as a novel strategy of complement inhibition for the treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014. **123**: 2094–2101.
- Nichols, E. M., Barbour, T. D., Pappworth, I. Y., Wong, E. K., Palmer, J. M., Sheerin, N. S., Pickering, M. C. et al., An extended mini-complement factor H molecule ameliorates experimental C3 glomerulopathy. *Kidney Int.* 2015. **88**: 1314–1322.
- Mastellos, D. C., Yancopoulou, D., Kokkinos, P., Huber-Lang, M., Hajishengallis, G., Biglarnia, A. R., Lupu, F. et al., Compstatin: a C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention. *Eur. J. Clin. Invest.* 2015. **45**: 423–440.
- Mastellos, D. C., Reis, E. S., Yancopoulou, D., Hajishengallis, G., Ricklin, D. and Lambris, J. D., From orphan drugs to adopted therapies: advancing C3-targeted intervention to the clinical stage. *Immunobiology* 2016. **221**: 1046–1057.
- Ricklin, D. and Lambris, J. D., New milestones ahead in complement-targeted therapy. *Semin. Immunol.* 2016. **28**: 208–222.
- Laursen, N. S., Andersen, K. R., Braren, I., Spillner, E., Sottrup-Jensen, L. and Andersen, G. R., Substrate recognition by complement convertases revealed in the C5-cobra venom factor complex. *Embo. J.* 2011. **30**: 606–616.
- Martinez-Barricarte, R., Heurich, M., Valdes-Canedo, F., Vazquez-Martul, E., Torreira, E., Montes, T., Tortajada, A. et al., Human C3 mutation reveals a mechanism of dense deposit disease pathogenesis and provides insights into complement activation and regulation. *J. Clin. Invest.* 2010. **120**: 3702–3712.
- Rooijackers, S. H., Wu, J., Ruyken, M., van Domselaar, R., Planken, K. L., Tzekou, A., Ricklin, D. et al., Structural and functional implications of the alternative complement pathway C3 convertase stabilized by a staphylococcal inhibitor. *Nat. Immunol.* 2009. **10**: 721–727.
- Paixao-Cavalcante, D., Torreira, E., Lindorfer, M. A., Rodriguez de Cordoba, S., Morgan, B. P., Taylor, R. P., Llorca, O. et al., A humanized antibody that regulates the alternative pathway convertase: potential for therapy of renal disease associated with nephritic factors. *J. Immunol.* 2014. **192**: 4844–4851.
- Forneris, F., Ricklin, D., Wu, J., Tzekou, A., Wallace, R. S., Lambris, J. D. and Gros, P., Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science* 2010. **330**: 1816–1820.
- Rodriguez de Cordoba, S., Hidalgo, M. S., Pinto, S. and Tortajada, A., Genetics of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). *Semin. Thromb. Hemost.* 2014. **40**: 422–430.
- Sanchez-Corral, P., Gonzalez-Rubio, C., Rodriguez de Cordoba, S. and Lopez-Trascasa, M., Functional analysis in serum from atypical Hemolytic Uremic Syndrome patients reveals impaired protection of host cells associated with mutations in factor H. *Mol. Immunol.* 2004. **41**: 81–84.
- Risitano, A. M., Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other complement-mediated hematological disorders. *Immunobiology* 2012. **217**: 1080–1087.

- 27 Ham, T. H. and Dingle, J. H., Studies on destruction of red blood cells.II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria:certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J. Clin. Invest.* 1939. **18**: 657–672.
- 28 Thurman, J. M., Kulik, L., Orth, H., Wong, M., Renner, B., Sargsyan, S. A., Mitchell, L. M. et al., Detection of complement activation using monoclonal antibodies against C3d. *J. Clin. Invest.* 2013. **123**: 2218–2230.
- 29 Risitano, A. M., Notaro, R., Marando, L., Serio, B., Ranaldi, D., Seneca, E., Ricci, P. et al., Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 2009. **113**: 4094–4100.
- 30 Hill, A., Rother, R. P., Arnold, L., Kelly, R., Cullen, M. J., Richards, S. J. and Hillmen, P., Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* 2010. **95**: 567–573.
- 31 Lin, Z., Schmidt, C. Q., Koutsogiannaki, S., Ricci, P., Risitano, A. M., Lambris, J. D. and Ricklin, D., Complement C3dg-mediated erythrophagocytosis: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2015. **126**: 891–894.
- 32 Montes, T., Tortajada, A., Morgan, B. P., Rodriguez de Cordoba, S. and Harris, C. L., Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. **106**: 4366–4371.
- 33 Subias, M., Tortajada, A., Gastoldi, S., Galbusera, M., Lopez-Perrote, A., Lopez Lde, J., Gonzalez-Fernandez, F. A. et al., A novel antibody against human factor B that blocks formation of the C3bB proconvertase and inhibits complement activation in disease models. *J. Immunol.* 2014. **193**: 5567–5575.
- 34 Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I. and Ludtke, S. J., EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 2007. **157**: 38–46.
- 35 Sorzano, C. O., Marabini, R., Velazquez-Muriel, J., Bilbao-Castro, J. R., Scheres, S. H., Carazo, J. M. and Pascual-Montano, A., XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J. Struct. Biol.* 2004. **148**: 194–204.
- 36 Goddard, T. D., Huang, C. C. and Ferrin, T. E., Visualizing density maps with UCSF Chimera. *J. Struct. Biol.* 2007. **157**: 281–287.
- 37 Janssen, B. J., Christodoulidou, A., McCarthy, A., Lambris, J. D. and Gros, P., Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity. *Nature* 2006. **444**: 213–216.
- 38 Alcorlo, M., Martinez-Barricarte, R., Fernandez, F. J., Rodriguez-Gallego, C., Round, A., Vega, M. C., Harris, C. L. et al., Unique structure of iC3b resolved at a resolution of 24 Å by 3D-electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. **108**: 13236–13240.
- 39 Chen, X., Yu, Y., Mi, L. Z., Walz, T. and Springer, T. A., Molecular basis for complement recognition by integrin alphaXbeta2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. **109**: 4586–4591.

Full correspondence: Prof. Oscar Llorca
e-mail: ollorca@cib.csic.es

Additional correspondence: Prof. Santiago Rodríguez de Córdoba, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain
e-mail: srdecordoba@cib.csic.es

Received: 11/10/2016
Revised: 15/12/2016
Accepted: 11/1/2017
Accepted article online: 13/1/2017